الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

(الجزء الأول)

تأليف

أ.د. عماد الدين حسين وصفى
أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات
كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية
حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التشجيعية عام ١٩٧٧
حائز على جائزة جامعة الإسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥



الدار العربية للنشر والتوزيع

الهندســـة الوراثيـــة
والوراثـــة الميكروبيـــة

الهندسة الوراثية والوراثة الميكروبية

الجزء الأول

تأليف
أ. د. عماد الدين حسين وصفى
أستاذ ورئيس قسم النبات الزراعى وأمراض النبات
كلية الزراعة – جامعة الإسكندرية
حائز على جائزة جامعة الأسكندرية التشجعية عام ١٩٧٧
حائز على جائزة جامعة الأسكندرية التقديرية عام ٢٠٠٥

الطبعة الأولى
٢٠٠٧

حقوق النشر

الهندســـة الوراثيـــة
والوراثـــة الميكروبيـــة

رقم الإيداع : ٢٠٠٦/٢٥٠٦٠
I. S. B. N. : 977-258-290-2

٣٢ شارع عبــاس العقاد - مدينة نصر
ت : ٢٧٥٣٣٣٥ فاكس : ٢٧٥٣٣٨٨

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يومًا بعد يوم. ولاشك أنه فى الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب فى أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها، الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً، طلابًا وطالبات، علماء ومثقفين، مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم، لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى - علوم الأمم الأخرى، وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار التركى، ثم البريطانى والفرنسى، عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير، وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء، والعلماء فى إنماء اللغة وتطويرها، حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة، والجامعة الأمريكية فى بيروت درستا الطب بالعربية أول إنشائها. ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيهما باللغة العربية لوجدناها كتبًا ممتازة لا تقل جودة عن أمثلتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر. وفرضت على أبناء الأمة فرضًا، إذ رأى المستعمر فى خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتسابًا لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر – فى أسرع وقت ممكن – إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام، والمهنى، والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظرًا لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكينًا للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متابطئة، أو تكاد تتوقف، بل تحارب أحيانًا ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات، ممن ترك الإستعمار فى نفوسهم عقدًا وأمراضًا، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهوديًا، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية، كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها ؟!.

وأخيرًا .. وتمشيًا مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقًا لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحدًا من ضمن ما نشرته – وستقوم بنشره – الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا .. ننفذ عهدًا قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحى، وفيما أرداه الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم: ﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ﴾.

محمد أحمد دربالة

الدار العربية للنشر والتوزيع

بسم الله الرحمن الرحيم

إهـــداء

من أســـرتي:

والدتي ووالدي وبناتي المهندستان مروه ومي وزوجتي

من أساتذتي:

إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور

عباس فتحي الهلالي

رائـــد علم أمراض النبات في مصر

وقد علمني الكثير من علمه وخلقه

إلى أستاذي المرحوم الأستاذ الدكتور

صلاح الدين عيد

أحد رواد ومؤسس علم النبات في مصر

وقد علمني أيضًا الكثير من علمه وخلقه

وأساتذتي الأفاضل أطال الله في عمرهم الأستاذ الدكتور مصطفى أبو الدهب: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات البكتيرية والفطرية.

الأستاذ الدكتور حسين العروسي: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.

الأستاذ الدكتور وجدي السواح: أحد أعلام أمراض النبات وأحد مؤسسي علم أمراض النبات الفطرية.

المقدمة

تعتبر الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية بمثابة الثورة العلمية الرابعة بعد الثورات العلمية المرتبطة بإستخدام البخار ثم الطاقة النووية فثورة المعلومات (ومنها علوم الكمبيوتر) ... وحيث أن العالم العربة بما فيه مصر لم يشترك بالبحث مع الدول المتطورة-فى الثورات العلمية الثلاث الأولى فإنه لم يعد مسموحًا أن تفوته ثورة الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ... ذلك أن الدول التى ستمتلك ناصية الثورة الرابعة خلال القرن القادم ستمتلك العالم ... إذ أن الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ترتبط بشتى نواحى العلم سواء الزراعى أو الدوائى أو الطبى أو البيطرى أو الهندسى أو البيئى وبما يتحكم فى غذاء وكساء وعلاج الإنسان وغيره من المخلوقات .. يحتاج الإلمام بالهندسة الوراثية إلى خلفية جيدة من علوم كثيرة ومنها الكيمياء والكيمياء الحيوية والإنزيمات وعلوم الكائنات الحية الدقيقة ومنها بالذات البكتيريا والفطريات والفيرس وعلوم الوراثة والخلية والوراثة السيتولوجية وأيضًا علوم النبات وكثير من علوم الزراعة وأيضًا علوم الحيوان وأيضًا علوم الطب والصيدلة وخاصة فسيولوجى الإنسان ولذلك فإنه من الصعب تأليف مؤلف واحد فقط عن الهندسة الوراثية ولذلك فإن هذا الكتاب سيكون إن شاء الله أول مؤلف فى هذه السلسلة والتى ستصدر تباعًا. هذا الكتاب يضم كثير من أساسيات الهندسة الوراثية وسيتم إستكمال الكثير منها فى مؤلفات تالية إن شاء الله.

سيتم إستخدام إصطلاح توطين الجين Gene cloning بدلاً من الإستنساخ فى هذا الكتاب لأن هذه التسمية أفضل وأدق علميًا.

بعد إنتشار مؤلفاتى السابقة فى العالم العربى وحيث يصلنى عنها خطابات من جميع الدول العربية من الجزائر والمغرب غربًا إلى السعودية والعراق شرقًا واليمن والسودان جنوبًا فإننى أهدى هذا المؤلف إلى جميع قراء العالم العربى وهو شامل ومبسط وحديث.

هذا المؤلف شامل ومناسب لخريجي كليات الزراعة والعلوم والتربية والطب والطب البيطرى والهندسة الصحية والصيدلية وجميع المهتمين بالهندسة الوراثية فى جميع المجالات السابقة.

أدعو من الله العلى القدير أن يلهمنى الصواب ويوفقنى فى مؤلفات قادمة.

"إنما يخشى الله من عباده العلماء"

المؤلف

المحتويات

الموضوع | الصفحة

الجزء الأول

الجزء الثاني

الباب الأول

الأحماض النووية

الأحـمـاض النوويـة

الأسماء الهامة فى نشوء وتقدم الوراثة والهندسة الوراثية

- جريجور مندل عام ١٨٦٦ Gregor Mendel نشر أبحاثه عـن الوراثـة فـى البسلة وملاحظاته أن الصفات يتحكم فيها عوامل "discrete "factors.
- أوسكار هيرتوج عام ١٨٧٥ (١٨٤٩-١٩٢٢) Oskar Hertwig. سيتولوجى ألمانى شرح طريقة الإخصاب وتكوين الزيجوت.
- والثار فليمنج عـام ١٨٧٩-١٨٨٥ (١٨٤٣-١٩٠٥) Walther Flemming سيتولوجى ألمانى. شرح سلوك الكروموسومات أثناء إنقسام الخليـة وسـماه mitosis.
- أوجسـت وايزمـان عـام ١٨٨٦ (١٨٣٤-١٩١٩) August Weismann. بيولوجى ألمانى. نشر نظرية عن إسـتمرارية germ plasm خـلال الأجيـال المختلفة.
- ثيودور بوفيرى عام ١٨٨٧-١٨٩٢ وآخرون (١٨٦٢-١٩١٥) سـيتولوجى ألمانى وصف الإنقسام الإختزالى وبالتالى أثبت تكهنات وايزمان عـن وجـود reduction division.
- هوجو دى فريز Hugo de Vries وعالم نبات ألمـانى كـارل كـورنيز Karl Correns (١٨٩٤-١٩٣٣) وعالم نبات نمساوى إريش فون تشير ميك Erich von Tschermak (١٨٧١-١٩٦٢). كل منهم مسـتقل علـى حـدة أعـادوا إكتشاف أبحاث مندل عام ١٩٠٠.
- والترسـتون عـام ١٩٠٣ Walter Sutton (١٨٧٧-١٩١٦). سـيتولوجى أمريكى وضح ووصف سلوك الكروموسومات أثناء الإنقسام الإختزالى شـارحا بذلك قوانين مندل وإقتراح أن الجينات موجوده على الكروموسومات.

- ويلهام جوهانســون عــام ١٩٠٩ Wilhelm Johannsen (١٨٥٧-١٩٢٧). عالم نبات هولندى. إبتكر لفظ الجين.
- فرانس ألفونس جانسينز عام ١٩٠٩ Frans-Alfons Janssens وصف العبور crossing over.
- توماس مورجان عــام ١٩١٠ Thomas Hunt Morgan إكتشــف صــفات أو عوامل مرتبطة بالجنس sex-linked traits فى حشرة الدروسوفيلا.
- ألفريد ستورتيفانت عام Alfred sturtevant (١٨٩١-١٩٧٠). عــالم وراثــة أمريكى. نشر لأول مرة فى التاريخ خريطة وراثية لجينات حشرة الدروسوفيلا.
- كالفن بريدج عام ١٩١٦ Calvin Bridges (١٨٨٩-١٩٣٨). عــالم وراثــة أمريكى. أثبت نظرية الكروموســوم فــى الوراثــة chromosome theory in heredity.
- هيرمان موللر عام ١٩٢٧ (١٨٩٠-١٩٦٧) Herman Muller. عالم وراثــة أمريكى. أثبت أن أشعة إكس يمكن أن تحدث طفرات.
- رونالد فيش عام ١٩٣٠ (١٨٩٠-١٩٦٢). عالم إحصاء إنجليزى. نشر كيفية أن الوراثة عامل هام فى الإنتخاب الطبيعى The genetical theory of natural selection. تعتبــر مفتــاح لتحــديث نظريــة دارون a key work in neo-Darwinism.
- جورج بيدل وإدوارد تاتم عــام ١٩٤١ (١٩٠٣-١٩٨٩) Edward Tatum, George Beadle. عالمان أمريكيان. وقد نالا جائزة نوبــل عــام ١٩٥٨ فــى الفسيولوجى والطب. وقد عملا سويا وقد بدءا العمل بطفــرات فــى التغذيــة nutritional mutants لفطر Neurospora ومن هذه الأبحاث تمكنا من وضــع نظرية جين واحد لإنزيم واحد one gene-one enzyme.
- أوزوالد أفرى وزملاؤه عام ١٩٤٤ Oswald and colleagues أثبــت أن دنــا عبارة عن مادة وراثية.

- إيروين شارجاف عام ١٩٤٧ Erwin Chargaff. أثبت أن النسبة بين البيريميدين والبيورين فى دنا هى ١:١ .
- جيمس وطسن وفرانك كريك عام ١٩٥٣ James Watson and Francis Crick. إقترحا التركيب الجزيئى لدنا.
- جاك مونود وفرانسيوز يعقوب عام ١٩٦٠ (١٩١٠-١٩٧٦) Jacques Monod, Francois Jacob. عالمان كيمياء حيوية فرنسيان. أدخلا اللفظ operon ليدل على أى مجموعة من الجينات النشطة تعمل مع بعضها وتكمل بعضها فى تفاعل أو تفاعلات معينة.
- مارشال نيرينبرج وفيليب ليدر عام ١٩٦١-١٩٦٦. وهما عالمان كيمياء حيوية أمريكان Marshell Nirenberg (١٩٢٧)، Phillip Leder (١٩٣٤) وآخرون. فك شفرة الكود الوراثى the genetic code.
- بول برج عام ١٩٧٢ (١٩٢٦) Paul Berg عمل أول جزيئ دنا معاد صياغته Created the first recombinant DNA molecule وكان ذلك بواسطة الفاج لامدا Lambda Phage.
- ١٩٧٣ أول تجاب على تسخير الوراثة لتستخدم فى البكتيريا genetic manipulation تم عملها.
- والتر جلبرت وفريدريك سانجر عام ١٩٧٧. Walter Gilbert (١٩٣٢)، Frederick Sanger وزملائهم. علماء كيمياء حيوية أمريكان. إخترعوا طرق لكشف تتابع القواعد فى دنا DNA sequencing.
- ١٩٧٨ تم إنتاج إنسولين الإنسان بواسطة بكتيريا مهندسة وراثية.
- كارى ميولليس عام ١٩٨٣ Kary Mullis (١٩٤٤). عالم كيمياء حيوية أمريكى. صمم تفاعل Polymerase chain reaction PCR لتكبير دنا.
- ١٩٨٣ أول نبات محول تم عمله First transgenic plant is created.
- أليك جيفرى عام ١٩٨٤ Sir Alec Jeffreys (١٩٥٠). عالم وراثة إنجليزى عمل وطور بصمة الأصبع الوراثية لدنا DNA (or genetic) fingerprinting.

- ١٩٨٨ لأول مرة فأر مهندس وراثيًا – فأر قابل للإصابة بالسرطان أو مصاب بالسرطان a cancer prone mouse.
- لأول مرة تجارب حقلية لنباتات طماطم مهندسة وراثيًا فى الولايات المتحدة الأمريكية.
- بداية مشروع الخريطة الكروموسومية للإنسان بما تحمله من جينات The human genome project.
- ١٩٩٣ خروف محول أى مهندس وراثيًا لإنتاج بروتينات الإنسان فى اللبن الناتج منه. أى إنتاج لبن به بروتينات الإنسان.
- الطماطم المهندسة وراثيًا تباع فى الولايات المتحدة الأمريكية.
- إيان ويلموت عام ١٩٩٧ وزملاؤه Ian Wilmut. عالم وراثة بريطانى (إسكتلندى). أعلن عن مولد نعجة إسمها دوللى Dolly. وهو أول حيوان ثديى ينشث من تحضين خلية جسدية لحيوان بالغ.
- ١٩٩٨ أول تتابع القواعد كامل لطاقم وراثى لحيوان معقد complex animal (أى ليس من الحيوانات الأولية أو بسيط التركيب) وهو النيماتودا Caenorhabditis elegans تم نشره.
- ٢٠٠٢ أول قطة مستنسخة إسمها سي سي.
- ٢٠٠٢ بداية إستنساخ الإنسان. تم بالفعل إستنساخ أول مولود فى تاريخ البشرية وهو طفلة يوم ٢٧ ديسمبر فى الولايات المتحدة الأمريكية بواسطة دكتورة بريجيت بواسولييه وهى فرنسية. والطفلة المستنسخة من أم عمرها ٣١ سنة وتم أخذ الخلية من جلدها. إسم الطفلة Eve إيف.
- ٢٠٠٣ ثان مولود مستنسخ فى إيطاليا فى شهر يناير بواسطة سفيرينو أنيتورى.

الأحمـاض النوويـة

Nucleic Acids

النواة والأحماض النووية:

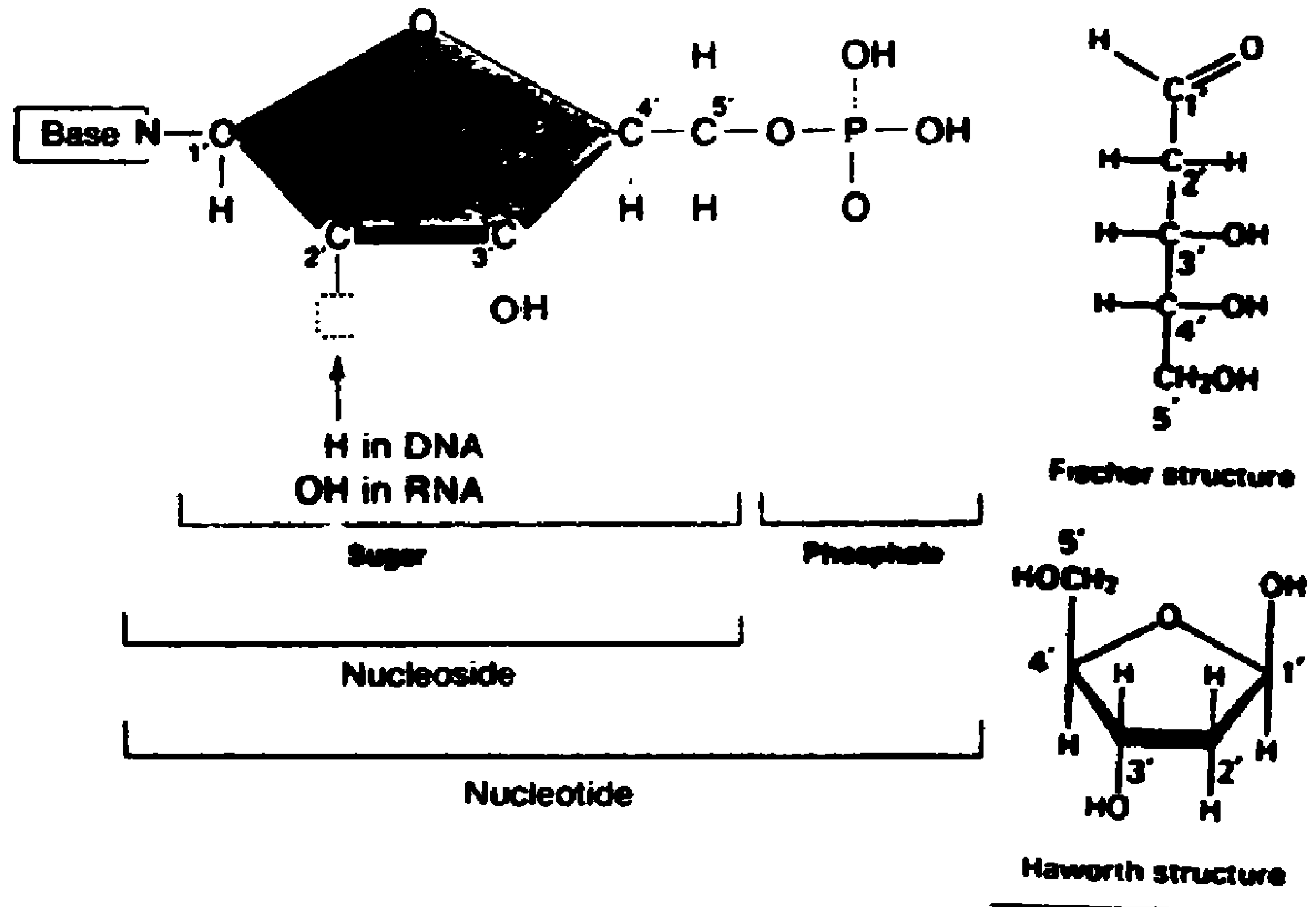
Nucleus and Nucleic Acids

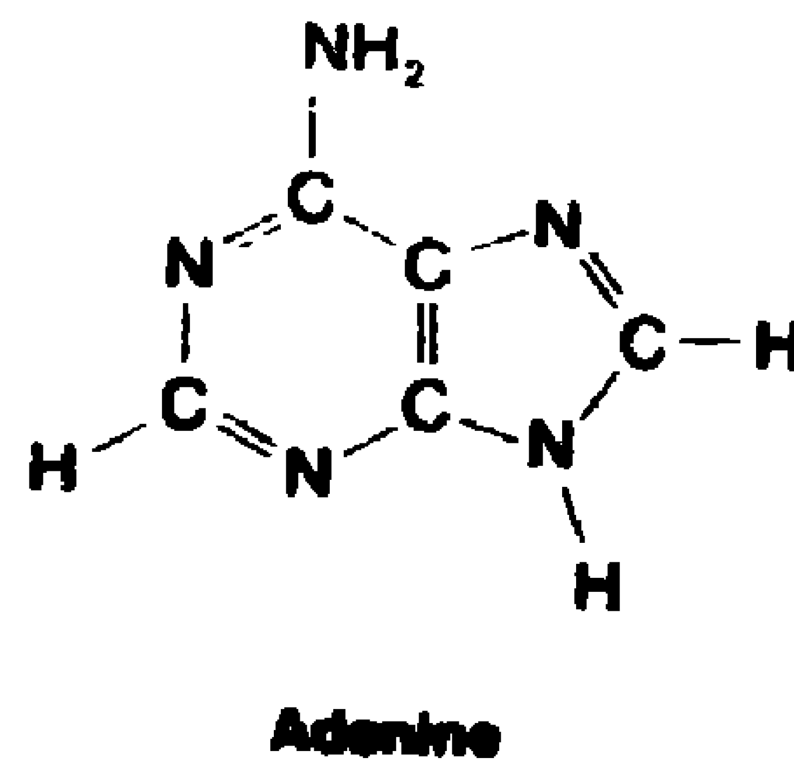
تقسم الكائنات الحية تبعًا لوجود النواة إلى ثلاثة مجاميع أو أقســام. المجموعــة الأولى كائنات ذات نواة حقيقية eukaryotes وهى كائنات فيها نــواة محــددة وذات التركيب العام المميز المعروف حيث أن للنواة جدار محدد واضح وبداخلها نويــة أو أكثر وسائل نووى وشبكة كروماتينية ومثال ذلك جميع النباتات وجيمــع الحيوانــات سواء عادية أو كائنات دقيقة عدا ما سيلى ذكره فى المجموعة الثانيــة. المجموعــة الثانية كائنات بدائية النواة prokaryotes وهى ليس فى الخلايا نــواة محــددة أى لا يوجد جدار للنــواة ولا توجــد النويــات. ومثــال ذلــك البكتيريــا والميكوبلازمــا والسبيروبلازما spiroplasma والطحالب الخضراء المزرقة. المجموعة الثالثة لــيس لها نوة أو شبه نواة مثل الفيروسات والفيرويدات viroids بل يوجد دنا DNA أو رنا RNA محاط بالبروتين أو حر.

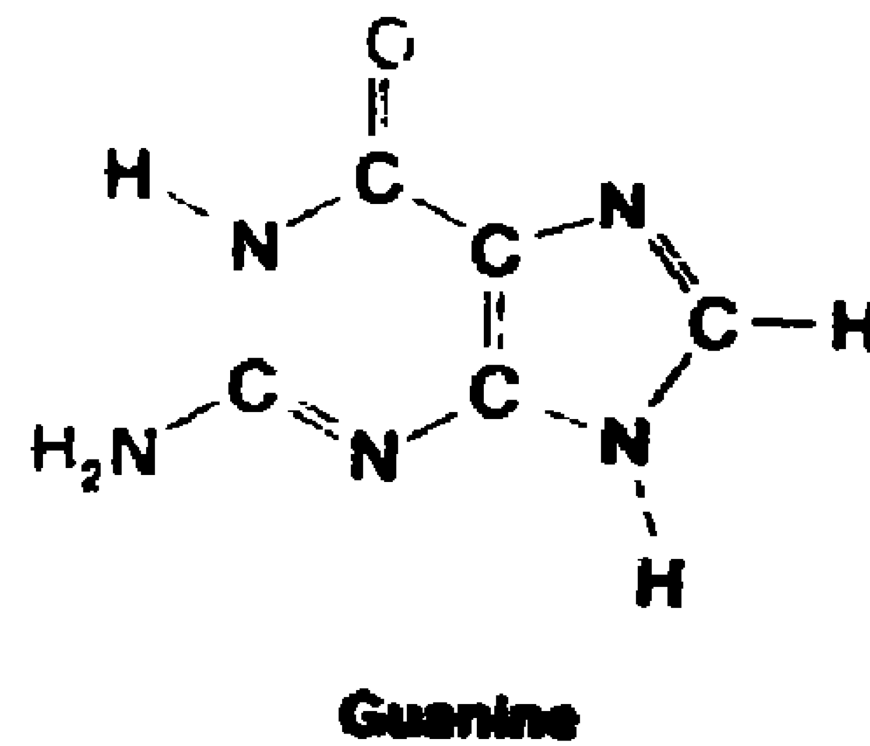
النواة جسم كروى أو بيضاوى عادة وتختلف فى أحجامها كثيرًا تبعًا لنوع الخلية ونوع النبات أو الحيوان، قد تتوسط الخلية وقد تكون جانبية. حــالات كــرات الــدم الحمراء فى الإنسان تكون خالية من النواة، حيث أن الخلية أثناء تكوينهــا تحتــوى على نواة وعند النضج تفقد نواتها. وفى حالة خلايا السرطان تكون النوة ذات شــكل غير طبيعى مشوه. وفى حالة الطحالب Acetabularia تكــون متطاولــة إســطوانية بدرجة ملحوظة. وفى حالة النبات فإن خلايا الأنابيب الغربالية الناضجة تكون عديمة النواة. ويرى البعض أن خلية الأنبوبة الغربالية تكون دائمًا على صلة وثيقة بخليــة مرافقة أو أكثر وكل خلية مرافقة لها نواتها التى تخدمها وقد تخدم الأنبوبة الغربالية المجاورة. تحتوى خلية النبات والإنسان والحيوان على نواة واحدة عادة إلا أنه فــى

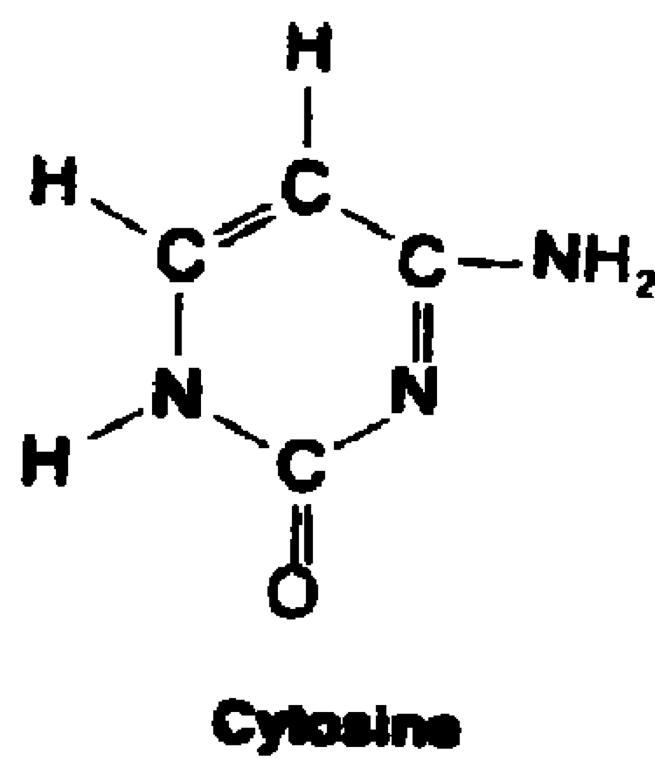
بعض الحالات كما فى الأنابيب اللبنية latex tubes فى النبات نجد أن الخلية الواحدة تحتوى على عديد من الأنوية. وفى بعض الفطريات نجد أن الخلية تحتوى على أكثر من نواة كما فى الفطريات البيضية والزيجوية وفطر *Rhizoctonia solani* وقليل من الطحالب مثل الفوشيريا *Vaucheria*.

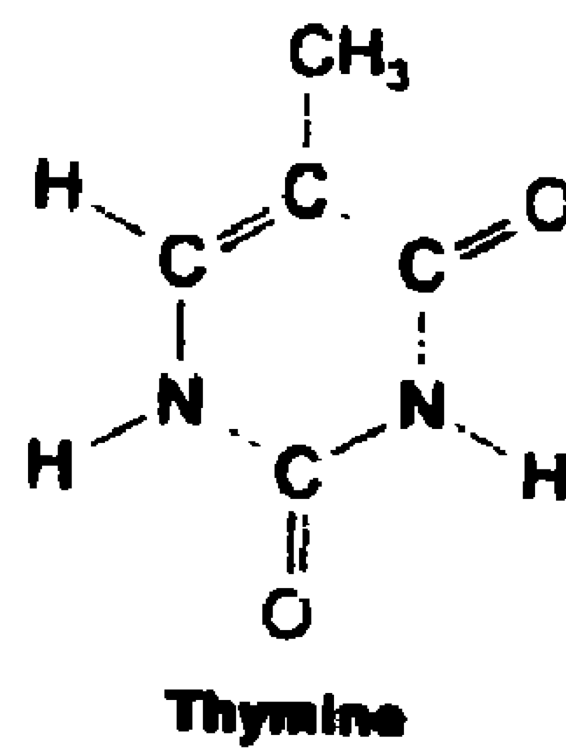
يوجد بالنواة نوعان رئيسيان من الأحماض النووية هما حامض الدى أوس ريبوز النووى deoxyribonucleic acid وإختصاره دنا والذى يرمز له بالرمز DNA وحامض الريبوز النووى ribonucleic acid وإختصاره رنا والذى يرمز له بالرمز RNA. يتركب كل من الحامضين النوويين من وحدات تسمى نيوكليوتيدات nucleotides. يتكون كل نيوكليوتيد من جزيىء من السكر الخماسى وجزيىء قاعدة نووية أى قاعدة نيتروجينية وجزيىء عبارة عن مجموعة فوسفات. يكون السكر الخماسى ريبوز فى حالة الحامض رنا والسكر الخماسى دى أوكس ريبوز فى حالة الحامض دنا. يختلف الريبوز عن الدى أوكس ريبوز فى أن الأول يوجد على ذرة الكربون رقم ٢ مجموعة أيد OH وأما الثانى فتوجد مجموعة أيد ناقصة أوكسجين أى توجد ذرة إيدروجين فقط بدلاً من مجموعة أ يد (شكل ١).

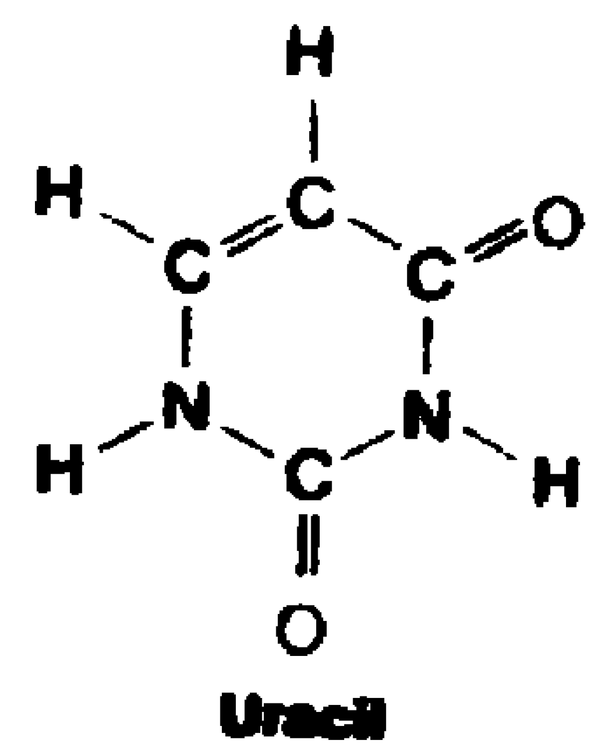




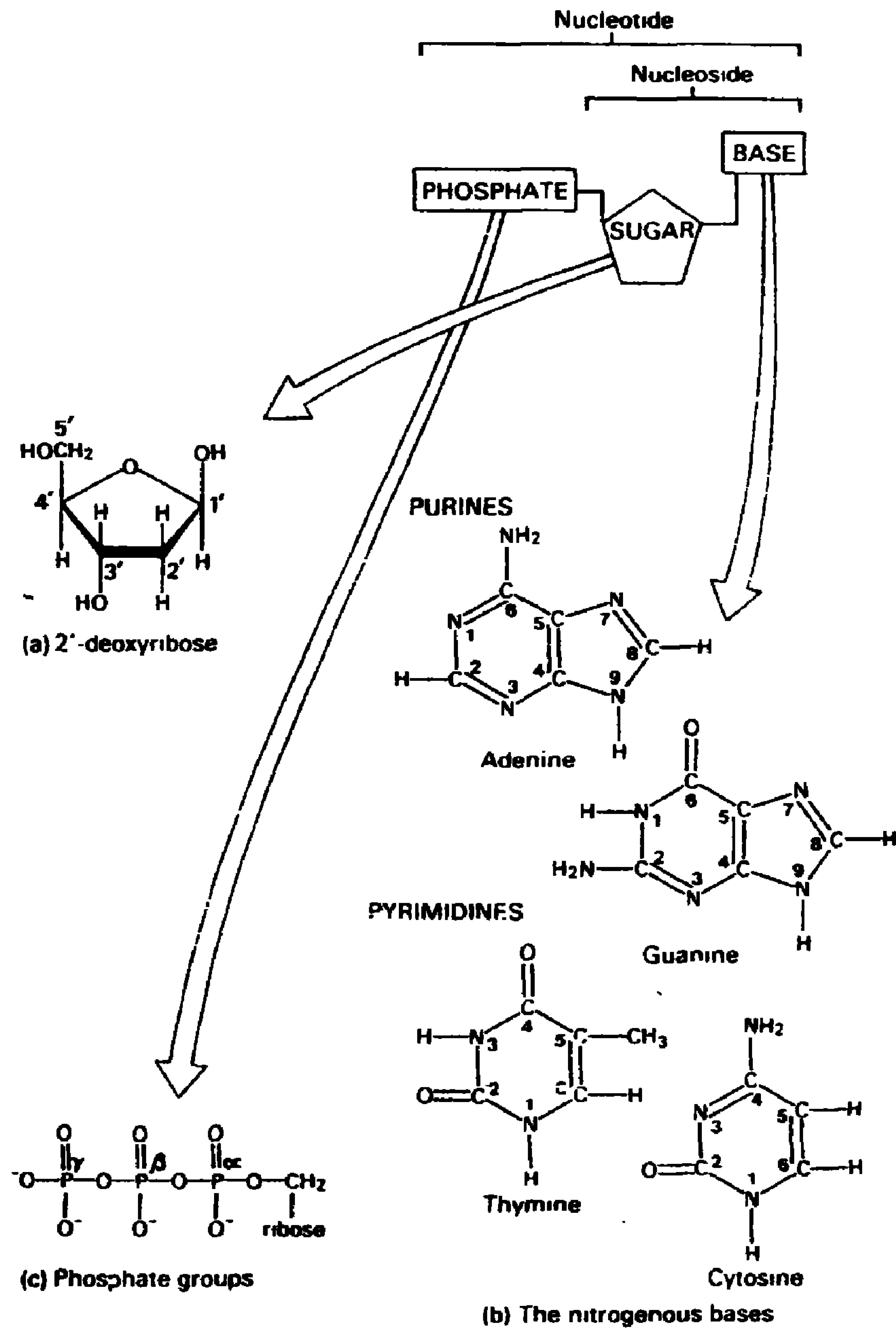




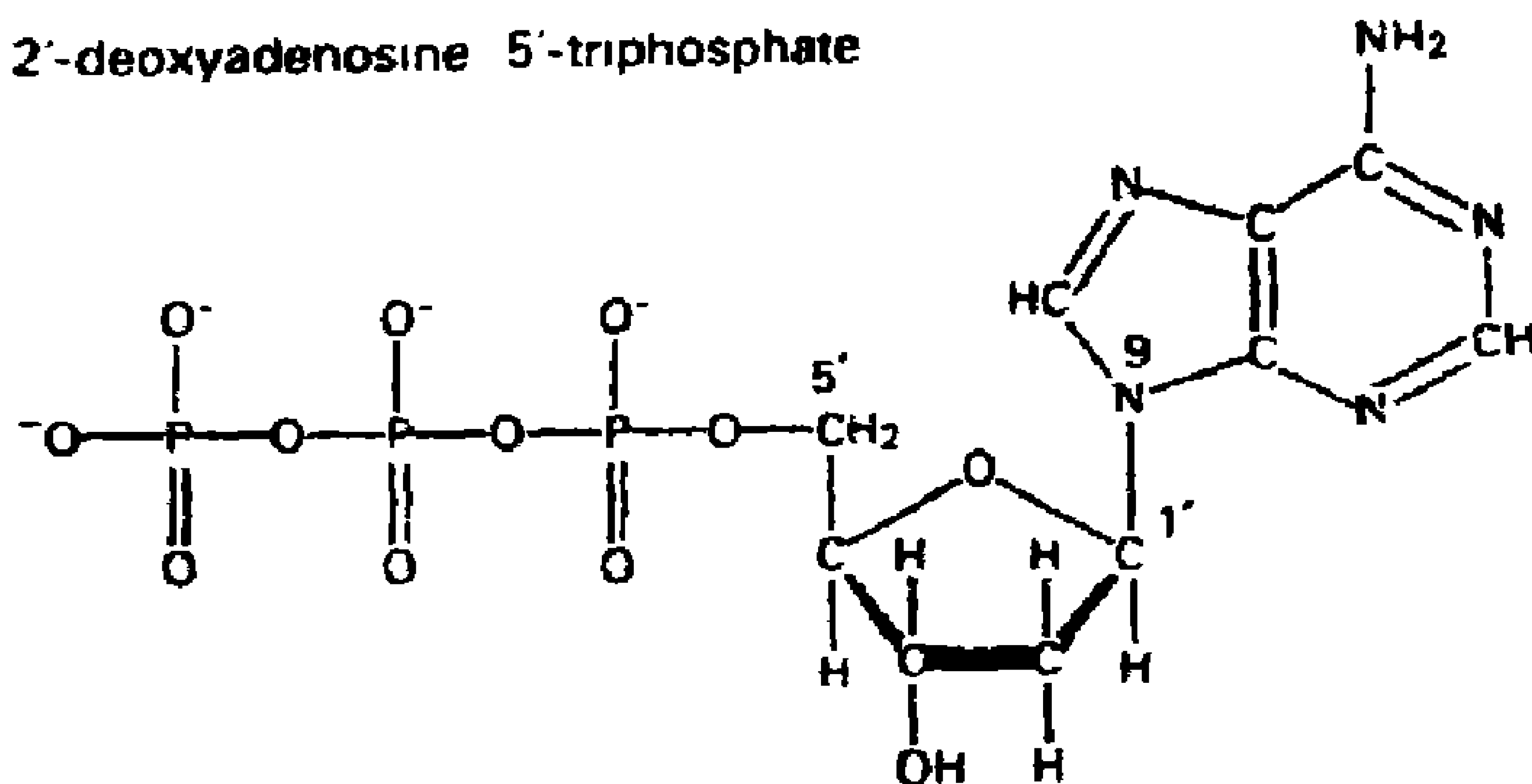


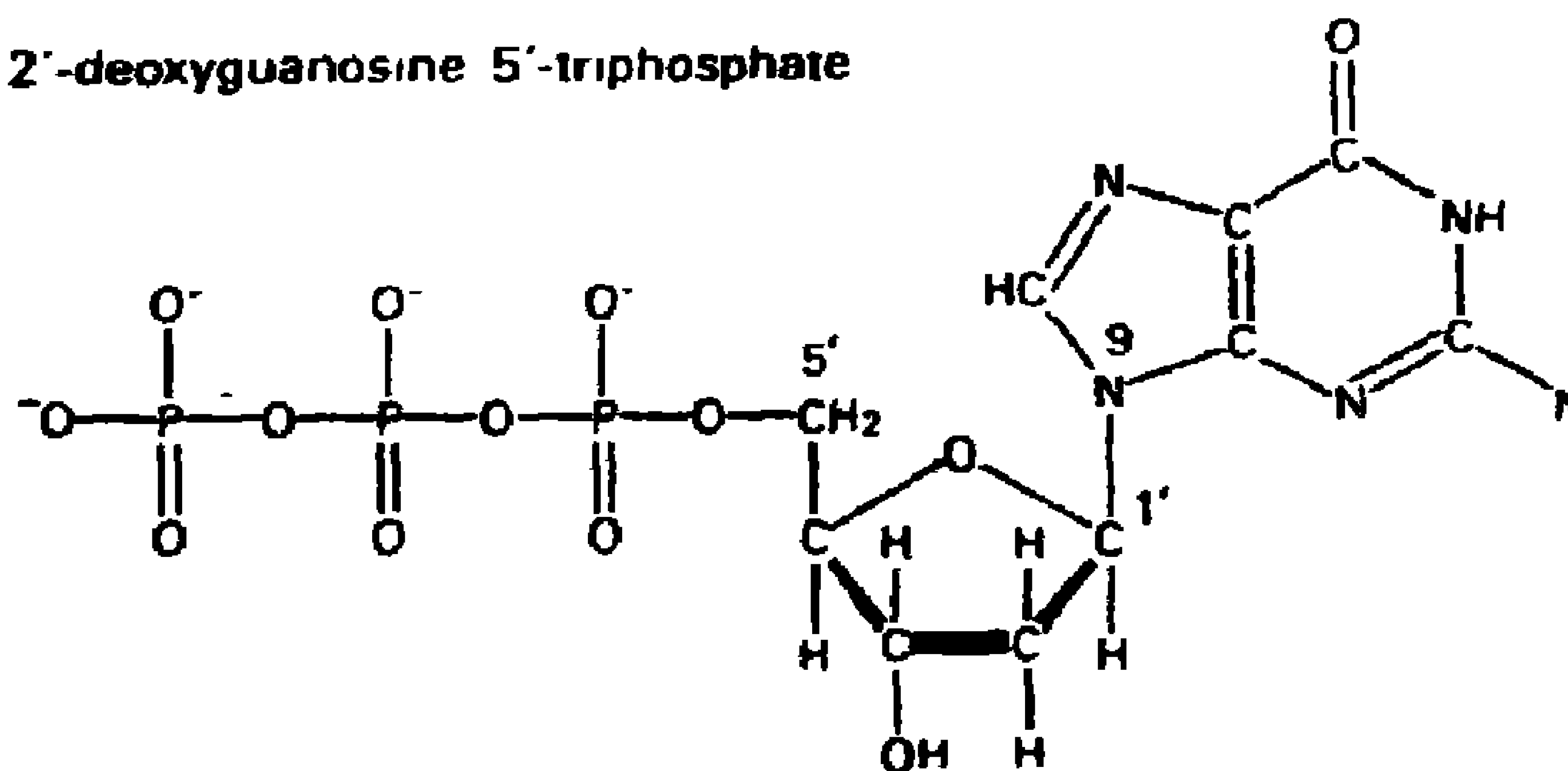


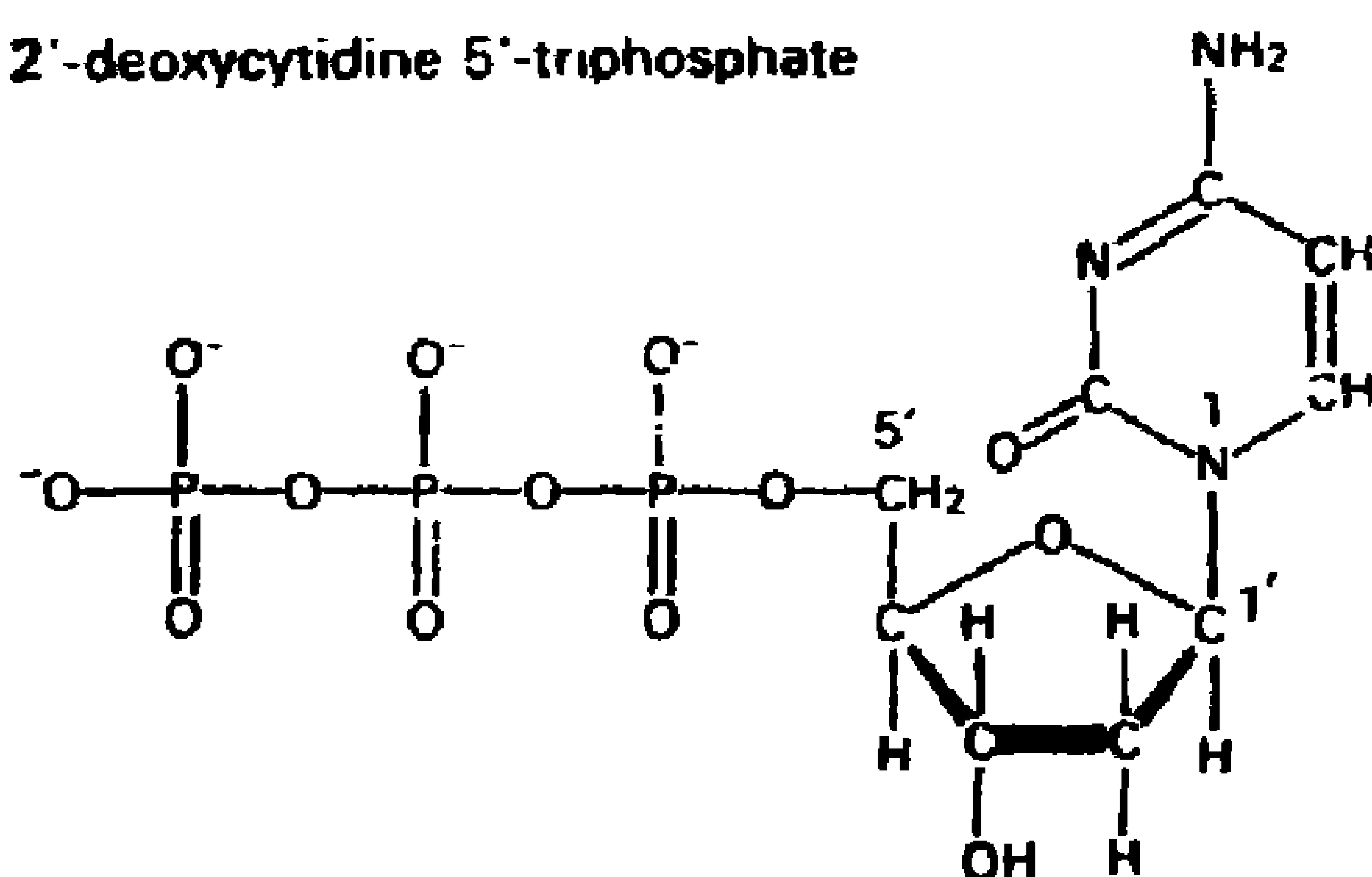
شكل ١ : تركيب نيوكليوتيد والفرق بين دنا ورنا وتركيب نيوكليوسيد. البيورينات (الأدينين والجوانين) البيريميدينات (سيتوسين وثيمين ويوراسيل). وتركيب دى أوكسى ريبوز وشكليه **two structural forms**.

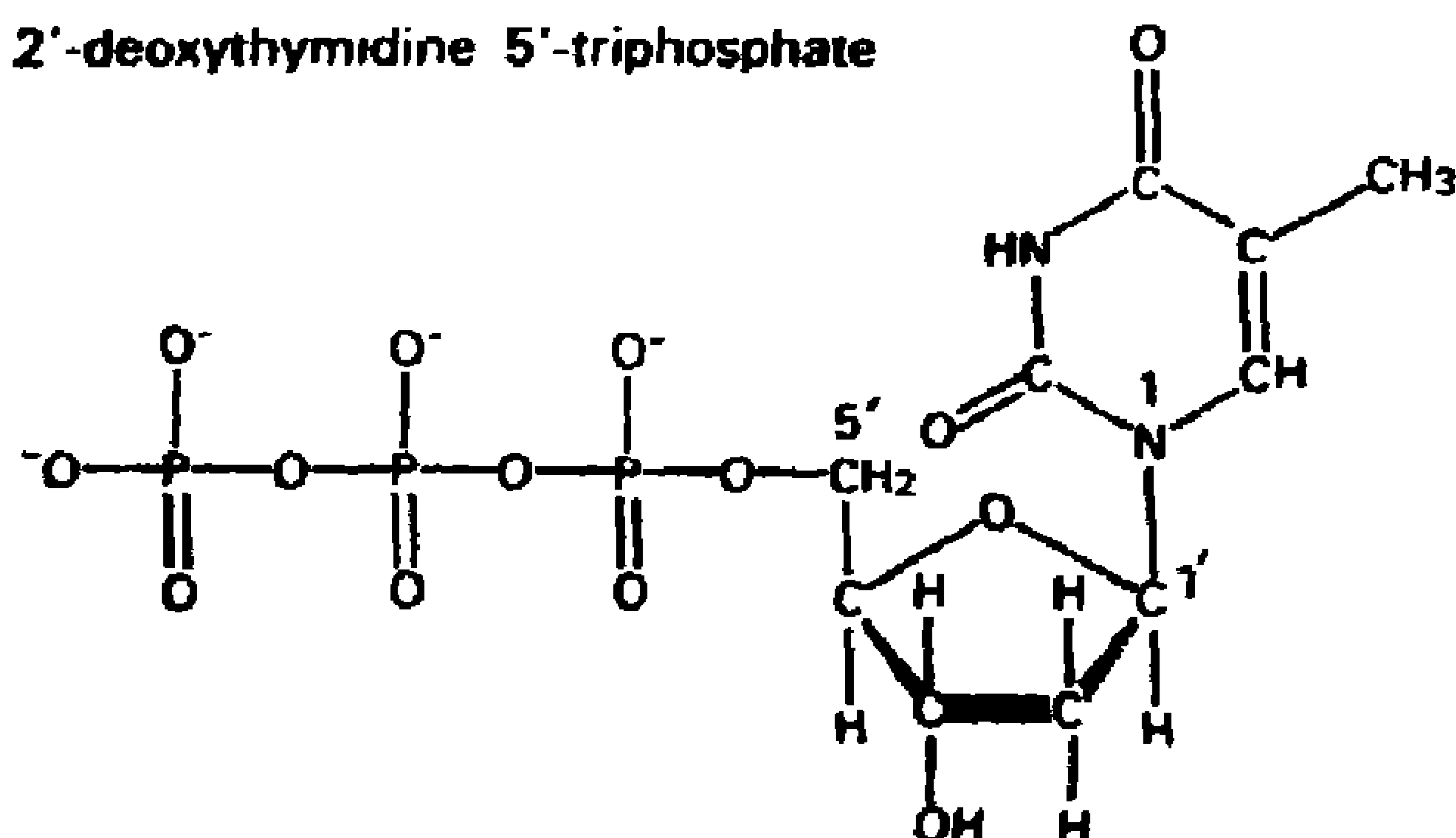


شكل ١٢أ: تركيب ومكونات دى أوكس ريبوينوكليوتيد **deoxyribonucleotide**.

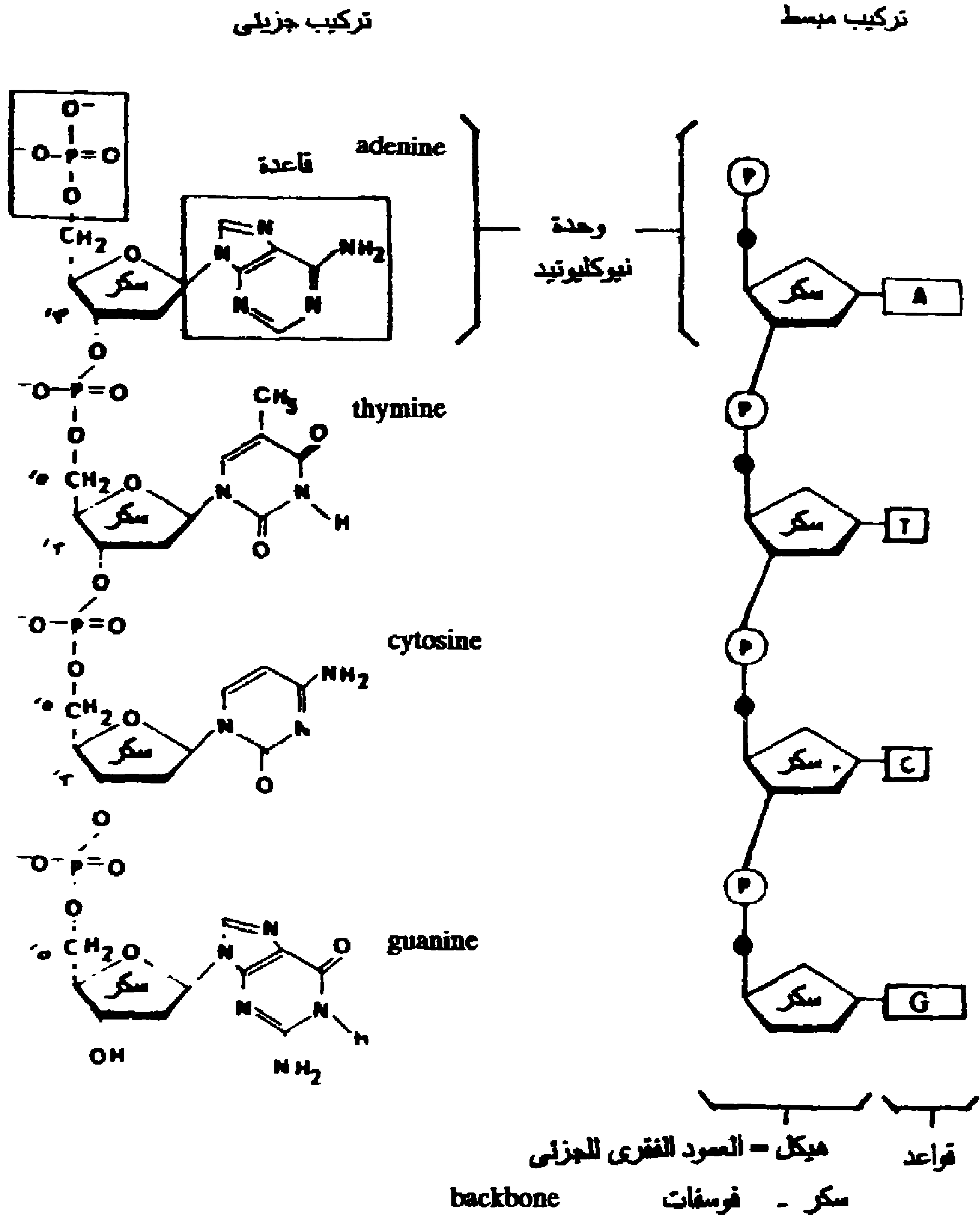








شكل ٢ب: تركيب الأربعة نيوكليوتيدات لحامض دنا.



شكل ١٣أ: شظية من دنا تركيب مبسط وتريب جزيئى.

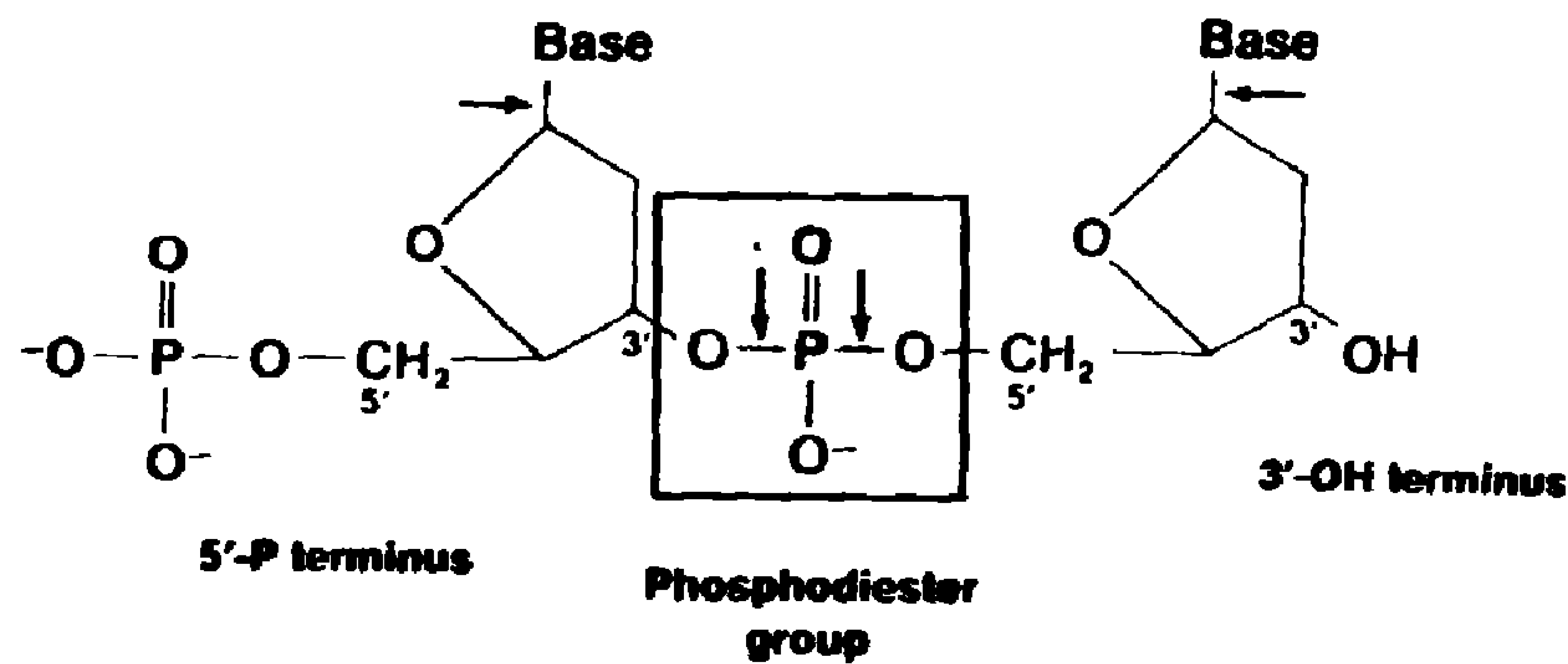
يرتبط مع السكر جزيىء فوسفات من ناحية وقاعدة نيتروجينية من ناحية أخرى. تتكون القاعدة النيتروجينية من أدينين adenine وجوانين guanine وسيتوسين cytosine يضاف إليهم ثيمين thymine فى حالة الحمض DNA ويوراسيل uracil

فى حالة الحمض RNA. القواعد النيتروجينية جزيئاتها حليقة فهى تتكون من حلقة واحدة سداسية كما فى سيتوسين وثيمين ويورراسيل وتعرف بالبيريميدات pyrimieines أو تتكون من حلقتين خماسية وسداسية كما فى أدينين وجوانين وتعرف بالبيورينات purines (شكل ١). ترتبط القاعدة النيتروجينية عند ذرة النيتروجين رقم ٩ مع ذرة الكربون رقم ١ فى السكر فى حالة البيورينات وذرة النيتروجين رقم ١ مع ذرة الكربون رقم ١ فى السكر فى حالة البيريميدات. ثم ترتبط مجموعة الفوسفات المسئولة عن الشحنة السالبة للأحماض النووية، مع السكر فى ذرة الكربون ٣ للسكر. ثم ترتبط مجموعة الفوسفات من طرفها الآخر مع جزيىء سكر آخر مع ذرة الكربون ٥ للسكر. وهكذا يرتبط السكر مع جزيىء بيورين أو بيريميدين بين ذرة السكر رقم ١وبين ذرة النيتروجين ٩ أو ١، تبعًا للبيورين أو البيرويميدين. ويرتبط جزيىء الفوسفات من أحد طرفيه بذرة الكربون رقم ٣ فى جزيىء سكر وطرفه الآخر بذرة الكربون رقم ٥ فى جزيىء سكر آخر (شكل ٢أ، ب). وهكذا يتكرر هذا الترتيب لتكوين عديد النيوكليوتيدات. وهكذا إن العمود الفقرى لجزيىء عديد النيوكليوتيدات هى فوسفات وسكر (شكل ٣-) يسمى جزيىء الفوسفات المتصل بالسكر من طرفيه بإسم ثنائى الإستر الفوسفورى (شكل ٣-ب).

Phosphodiester group. وهكذا فإن جزيىء عديد النيوكليوتيدات فى حالة دنا ورنا يتكون من نيوكليوتيدات عديدة متصلة ببعضها البعض (شكل ٦).

الحامض النووى دنا عبارة عن سلسلتين حلزونيتين من النيوكليوتيدات تلتفان حوال بعضهما ويربط بين بعض القواعد فى السلسلتين روابط إيدروجينية. وهذه الروابط تربط بين أدنين فى سلسلة وثيمين فى السلسلة الأخرى وأيضًا نفس الشىء بالنسبة لجوانين وسيتوسين (أشكال ٤، ٥، ٦). يوجد بين الثيمين والأدينين رابطتين إيدروجينيتين ولكن يربط بين جزيىء السيتوسين والجوانين ثلاثة روابط إيدروجينية (شكل ٤). وهكذا فإن أحد طرفى جزيىء دنا له طرف ٣ أى ثلاثة بشرطة علوية ويسمى 3´-OH terminus لأحد الحلزونين أما الحلزون الآخر

فطرفه 5 ويسمي 5´- P-erminus أما الطرف الآخر لجزيىء دنا أحد الحلزونين طرف 5´ والذى نهايته فى الطرف الأول 3´ والحزون الثانى طرفه 3´ والذى نهايتـــه فـــى الطرف الأول 5´ أى أن الشريطين متوازيين ولكن خلف خلاف antiparallel (شـــكل ٥). الشرطة التى توضع فوق 3 و 5 هى prime لتمييز أرقام ذرات كربون الســـكر الخماسى عن ذرات القواعد النيتروجينية ومجموعة الفوسفات ولذلك فإن أى شرطة prime معناها رقم لذرة الكربون بالسكر.



شكل ٣ب: تركيب نيوكليوتيدين. الأسهم الرأسية توضح الرابطتين فى مجموعة ثـــائى الإستر الفوسفورى phosphodiester والتى يحدث عندها دوران حر Free rotation. أما الأسهم الأفقية توضح الرابطة N الجليكوسيدية N-glycosidic bond والتى عندها القاعدة يمكن أن تدور بحرية freely rotate. وهكذا يتكون عديد النيوكليوتيدات من عديد مـــن النيوكليوتيدات مرتبطة بواسطة phosphodiester group.

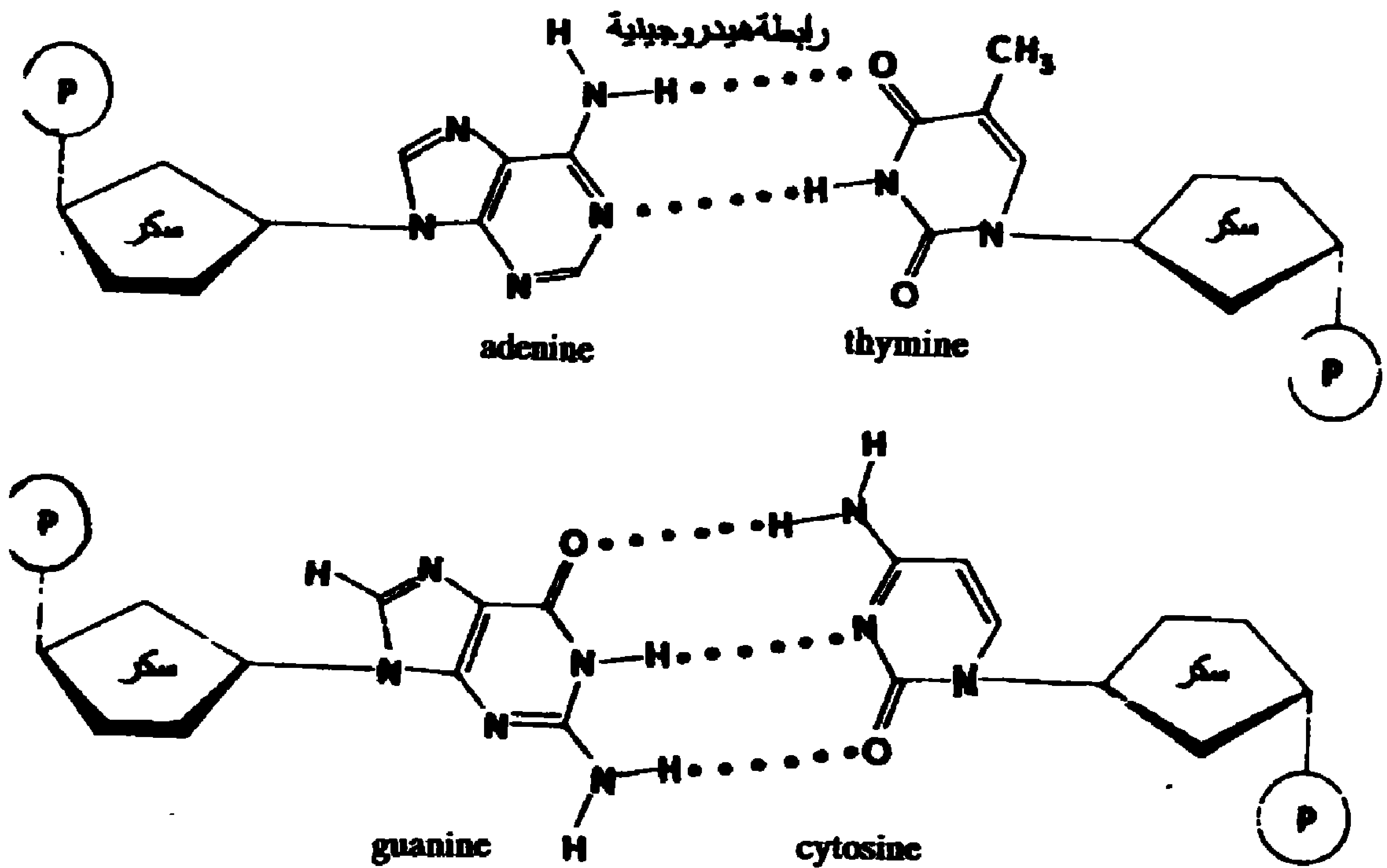
القاعدتين فى كل زوج قواعد متزواجين أى مرتبطين تقع فى نفس المســـتوى أو المسطح plane. مستوى كل زوج عمودى على محور الحلزون helix axis.

أزواج القواعد توجد فى ترتيب دائرى بجانب بعضها ولذلك فإنه يوجد ١٠ أزواج من القواعد لكل دورة حلزونية per helical turn. قطـــر الحلـــزونين double helix يكون ٣ نانومتر. الوزن الجزيئى لوحدة الطـــول للحلـــزون تكـــون ٢ × ١٠⁶ لكـــل ميكرومتر. وحيث أن الوزن الجزيئى لدنا البكتيريا يكـــون حـــوالى ٢ × ١٠⁹ فـــإن الجزيىء طويل جداً نسبياً حيث يصل طوله ١ مم.

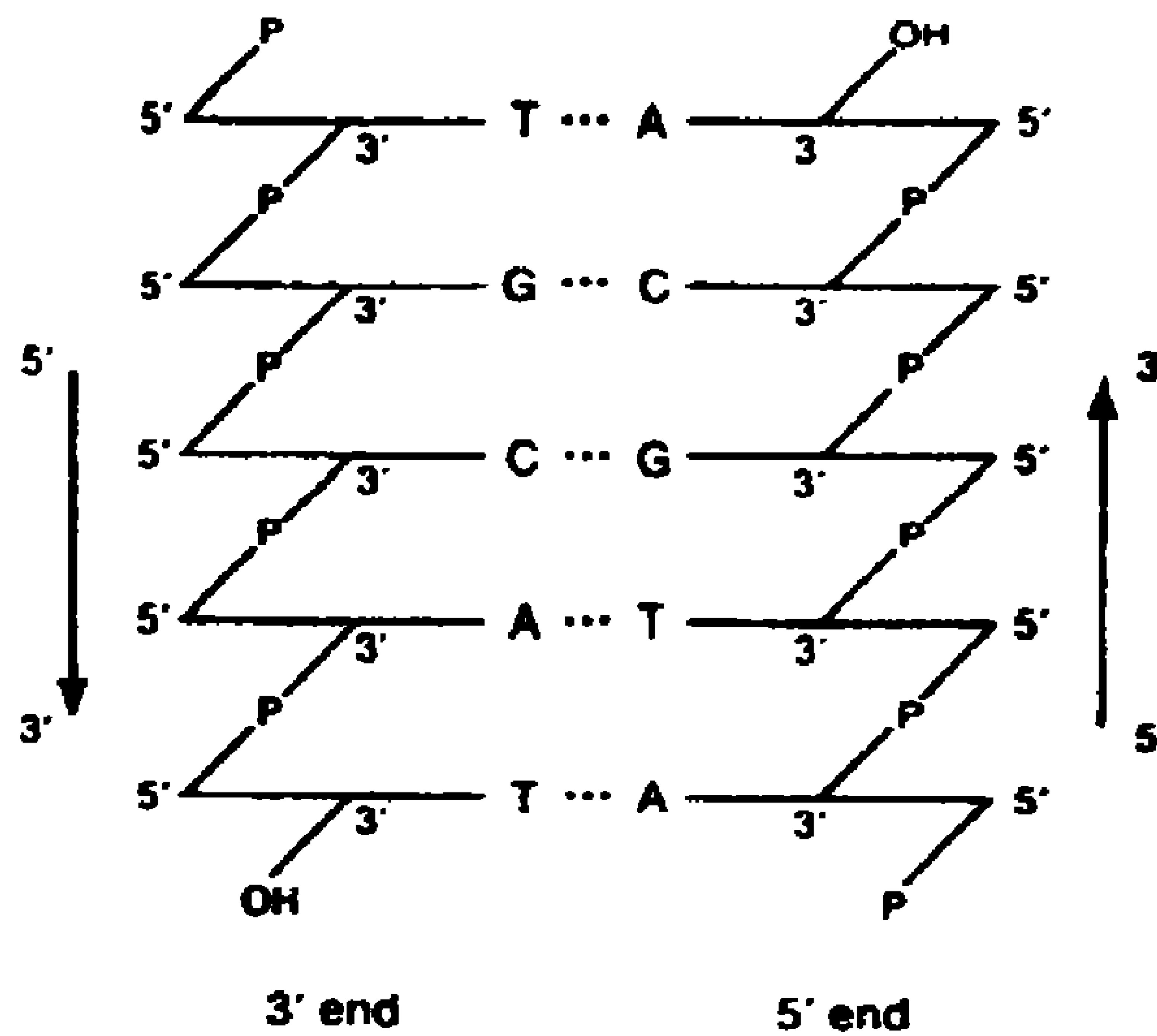
دنا يكون جزيىء حلزون يمينى right-handed helix. معنى ذلـك أن الحلـزون يوجد فى إتجاه عقارب الساعة عن النظر للحلزون من أسفل. جزيىء دنا له شـقين حلزونيين خارجيين to external helical grooves. شـق عميق واسع هـو الشـق الأكبر major groove وشق ضحل غير عميق ضيق يسمى الشق الأصـغر mimor groove (شكل ٧). أغلب البروتينات النووية تكون مرتبطة بجزيىء دنا فـى الشـق الأكبر.

جرى العرف على أن تكتب تتابع القواعد فى الحلزون دنا بكتابة النهاية `5 علـى اليسار ومثال لذلك لكتابة الثلاثة نيوكليوتيدات ATC تكون هي كالآتى:

P-5´ - ATC - 3´ - OH يمكن كتابتها أيضاً pApTpC.



شكل ٤: تزاوج القواعد الموجودة فى دنا وتكوين الروابط الإيدروجينيـة The two common base pairs of DNA.



شكل ٥ : شكل تخطيطي لشظية segment (جزء صغير) من حلزون دنا DNA duplex يوضح توجيه خلف لحلزوني دنا المتوازيين antiparallel orientation.

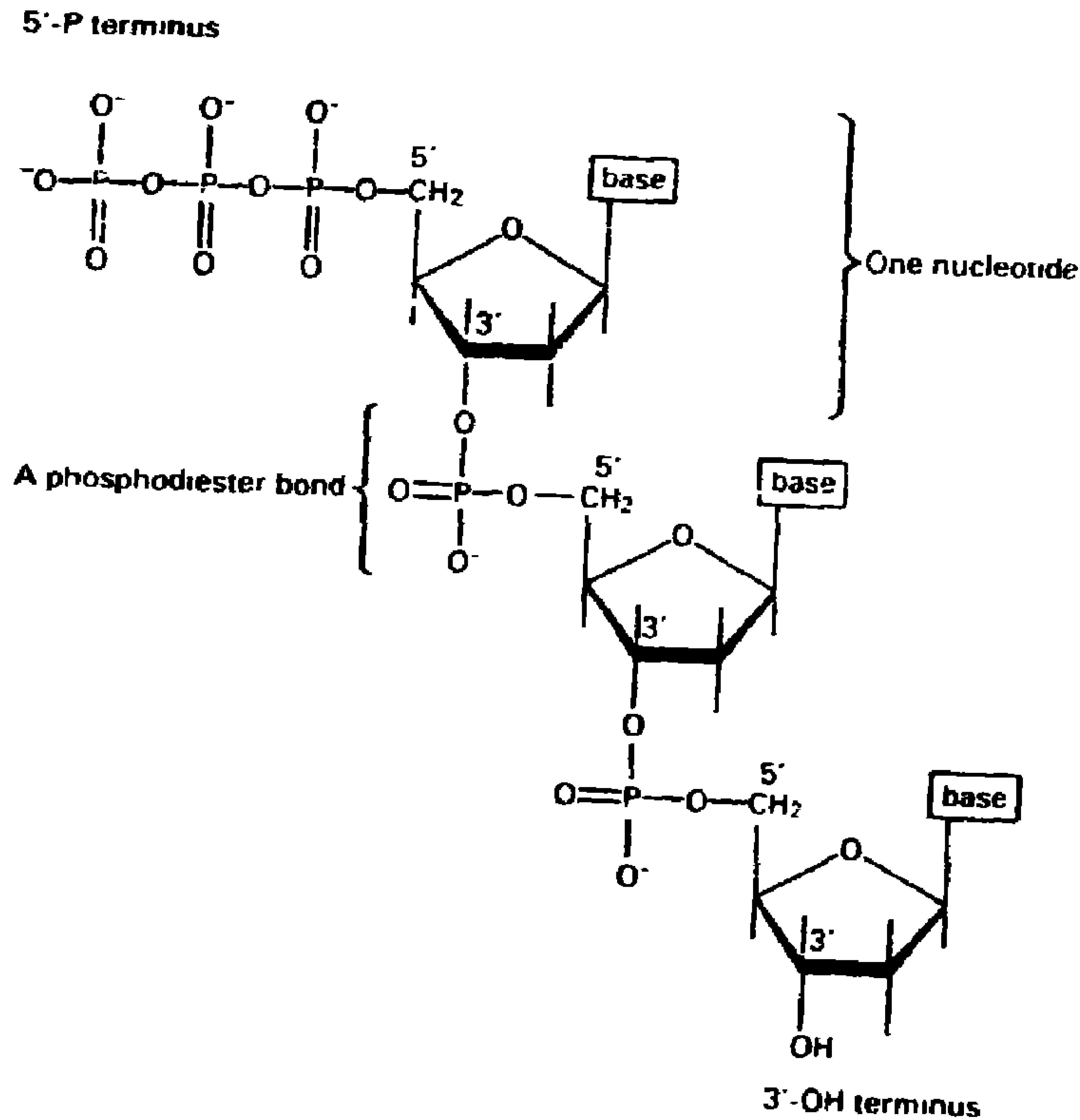
توضح الأسم الإتجاه 5^1 ←—— 3^1. حيث أن مجموعة الفوسفات (P) ترتبط بـذرة الكربون 3^1 لجزيىء دى أوكسى ريبو (يمثل جزيىء دى أوكسى ريبوز بخط أفقـى) وأن مجموعة الفوسفات هذه ترتبط هذه بذرة الكربون 51 لجزيىء دى أوكسى ريبوز آخر قريب.

أشكال وتركيب جزيىء دنا :

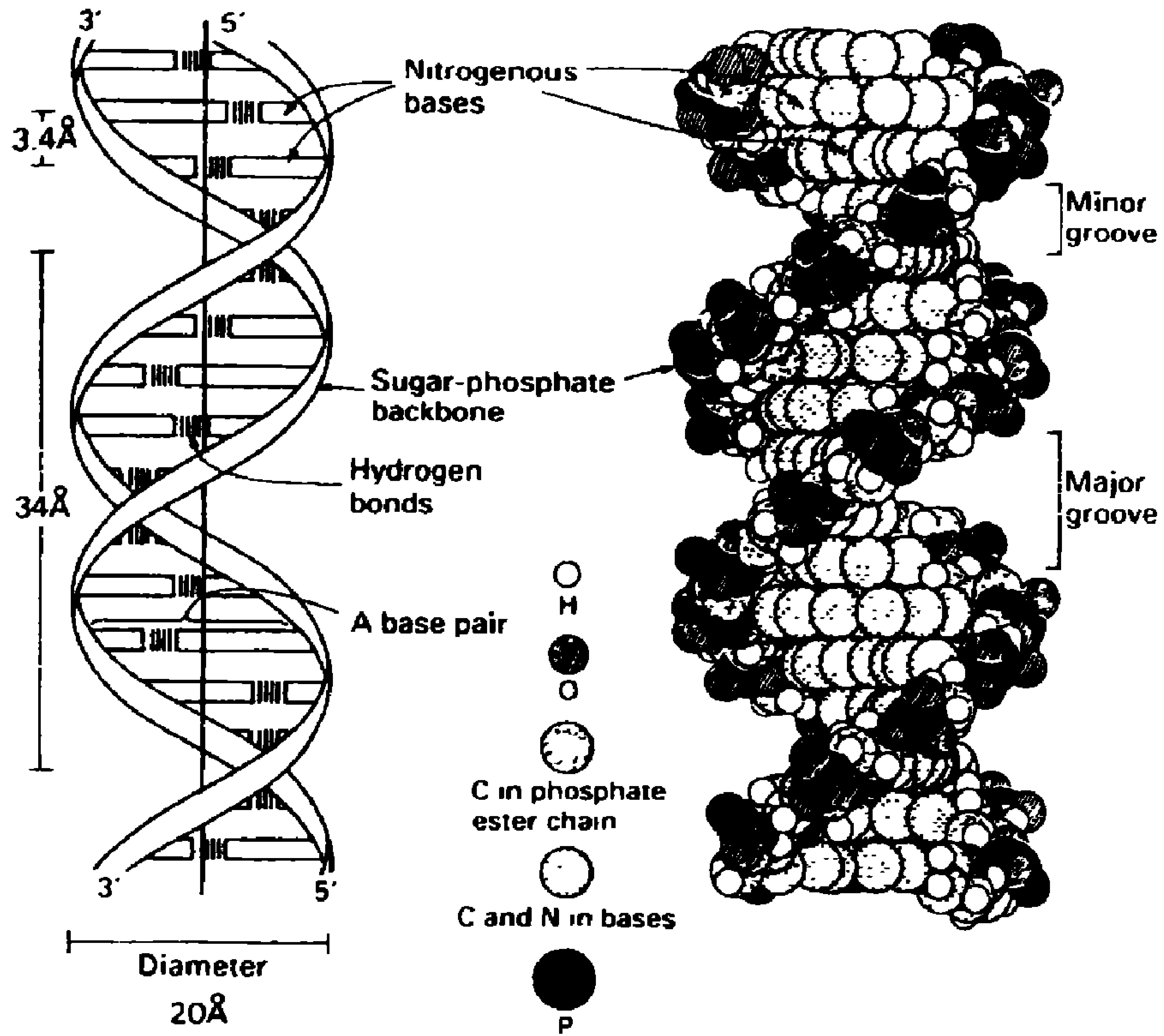
DNA Conformations

توجد ثلاثة حالات في هذا الصدد ومنها الحالتين الآتيتين. الشكل والتركيب الأكثر شيوعاً هو الشكل B أى B-DNA وهو يتميز بأنـه إلتفافـه يمينـى right handed when viewed end on وكل لفة بها أعلى قليلاً من عشرة قواعد (زوج) Just over 10 residues per turn. والشكل الثانى هو الشكل Z أى Z-DNA والذى ينشـأ فـى ظروف خاصة عندما يوجد تبادل فى تتابع قواعد البيريميدين والبيويميدين فـى دنـا ويكون إلتفافه يسارى left handed helix وكل لفة بها ١١,٥ (زوج) قاعدة لكل لفة

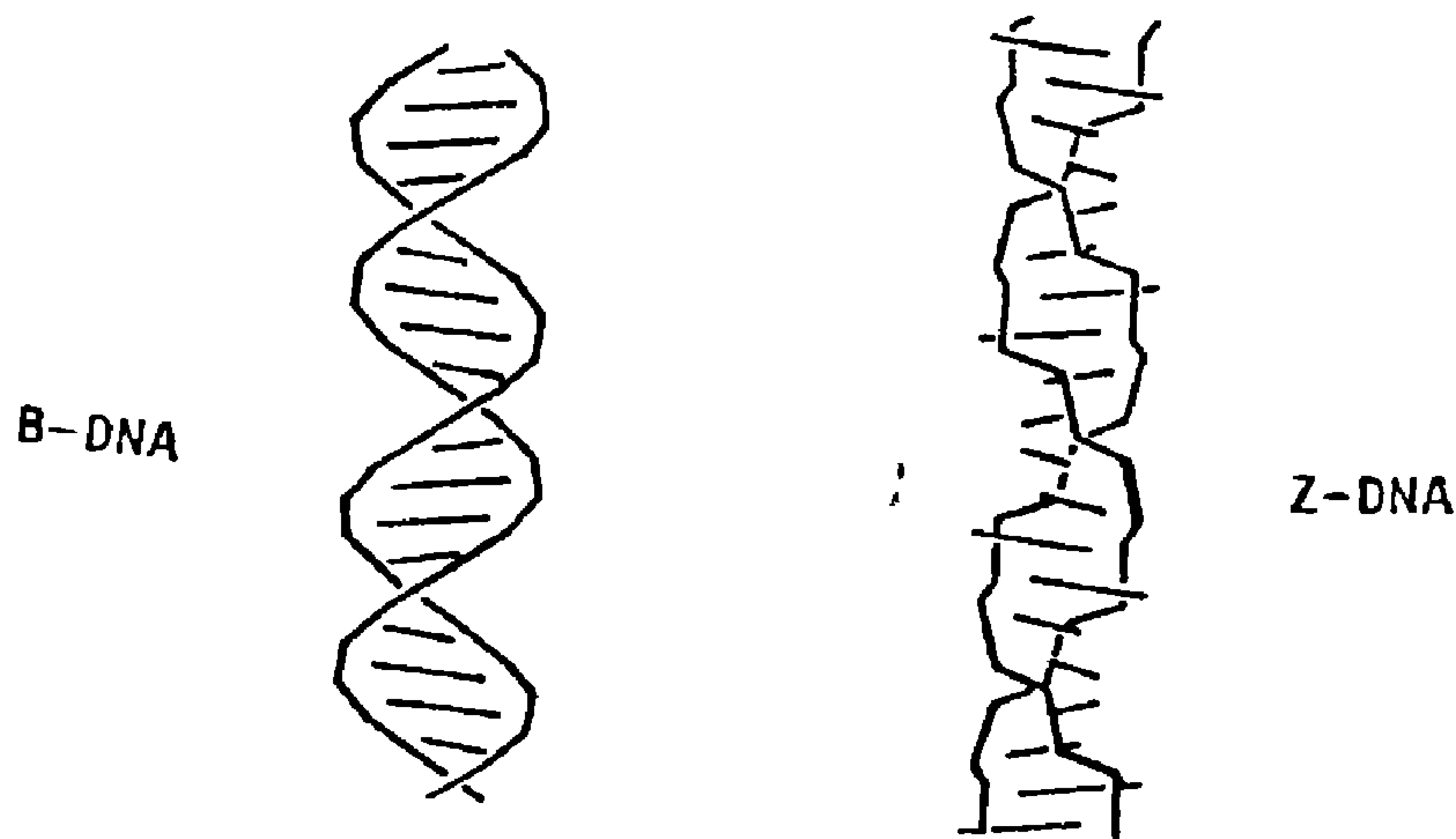
(شكل ١٧أ). يعتقد أن الشكل الأخير بعض الأهمية البيولوجية، حيث أنه يحدث تمدد قصير لبعض البيورينات والبيريميدينات المتبادلة فى مناطق عديدة من stretches جزيىء دنا فى بعض أنواع دنا. يمكن التعرف على هذا النوع من دنا وذلك لأنه يرتبط بالأجسام المضادة antibodies. الأجسام المضادة تتعرف على هذا النوع من دنا. يمكن أيضاً لبعض البروتينات الأخرى خلاف بروتينات الأجسام المضادة، وقد تم إكتشافها، والتى يمكن أن تتفاعل مع دنا Z فى كثير من الخلايا فى الكائنات الراقية والحشرات والبكتيريا والفيروسات.



شكل ٦: تركيب قليل النيوكليوتيدات فى دنا أو رنا The structure of an oligonucleotide of DNA or RNA أى تركيب جزء قصير من عديد النيوكليوتيدات The structure of a short polynucleotide.



شكل ٧: تركيب دنا. على اليسار شكل مبسط والذى نشر بواسطة وطسن وكريك فى حينه عند إكتشافه. وعلى اليمين شكل مجسم space-filling model فى محاولة لتوضيح الأحجام النسبية للذرات فى جزء دنا وترتيبها.



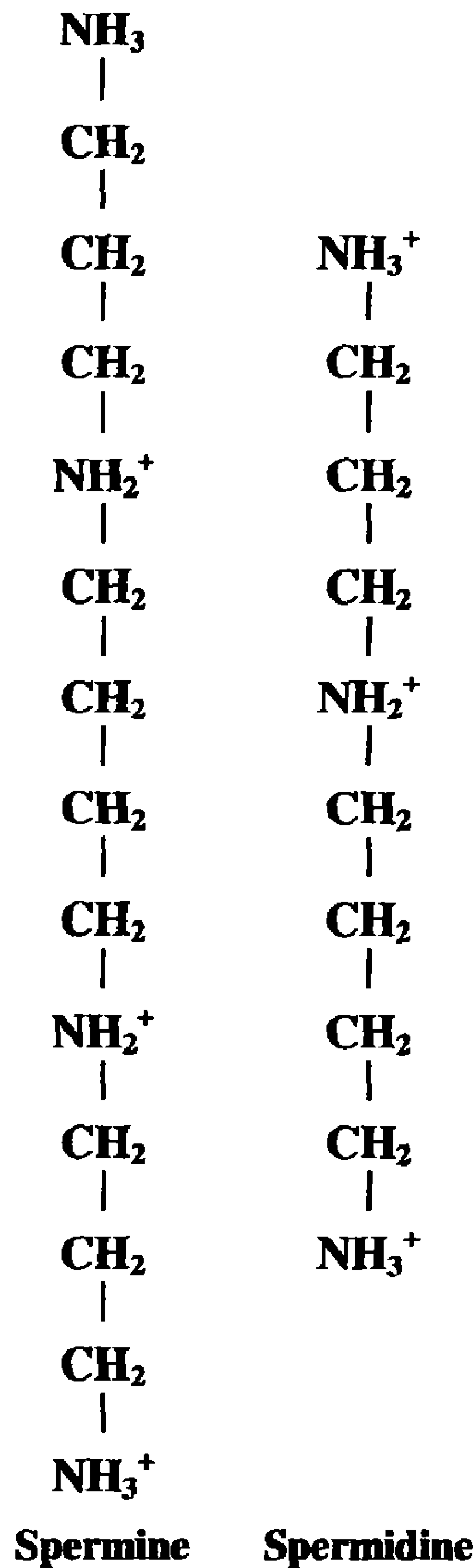
شكل ٧أ: طول جزء من حلزون دنا يتكون كل منهما من ٢٠ زوج قاعدة يوضحان الفرق بين الشكل أو النوع B والشكل أو النوع Z.

يوجد إختلاف كبير فى القابلية للماء أى للإمتـزاج بالمـاء حيـث أن القلـب أى القواعد المرتبطة المكونة قلب جزيىء دنا تكون كارهة للماء hydrophobic فى حين أن العمود الفقرى للجزيىء أى الجزء الخارجى عبارة عن السكر المفسـفر يكـون محب للماء hydrophilic (شكل ٧ب) بدرجة شديدة ولذلك فإن الإختلاف بينهما شديد فى هذه الصفة.



شكل ٧ب: المناطق المحبة للماء والكارهة للماء في جزيء دنا.

التنافر المتبادل mutual repulsion بين شحنات مجاميع الفوسفات تسبب تواجـد السلسلة فى شكل وتركيب خط مستقيم straight-line configuration. لو تم معاملة الشحنات وذلك بتفاعلها مع بعض امجاميع القاعدية الأخـرى basic groups وذلـك لتكوين ما يسمى بقنطرة الملح salt bridge formation فإن السلسلة تصـبح أكثـر مرونة. يمكن أن تكون هذه المجاميع القاعديـة هـى الجانـب القاعـدى لسلاسـل البروتينات. عامة خلاف البروتينات فإنه توجد بعض المركبات توجد ملازمة ومتصلة لبعض الأحماض النووية وأن هذه المركبات المنخفضة الـوزن الجزيئـى (شـكل ٧ جـ)، وهى عبارة عن مركبات عديدة الأمين polymines مثل سـبرمين spermine وسبيرميدين spermidine، ويكون فى هذه الحالات من المطلوب أن يكون الجزيئـى ذو شـكل ملتـوى متعـرج متـداخل where a highly convoluted structure is required. وهذه الحالة مثل البروتينات حيث أنه يحدث تفاعلات كارهة للماء وتكون مسئولة عن ثبات جزيىء دنا. فى حالة حدوث التفاعلات الكارهة للماء تحتاج إلـى حوالى ١٠٠٠ كالورى لكل جزيىء أى لكل زوج قاعدة مسئولة عن ربط حلزونى دنا مع بعضها. لا يوجد تعارض بين ذلك وبين الروابط الإيدروجينية التى تتكـون بـين قاعديتين ليحدث إتصالها أى إزدواجها وتكون مسئولة عن ثبات جزيىء دنا.

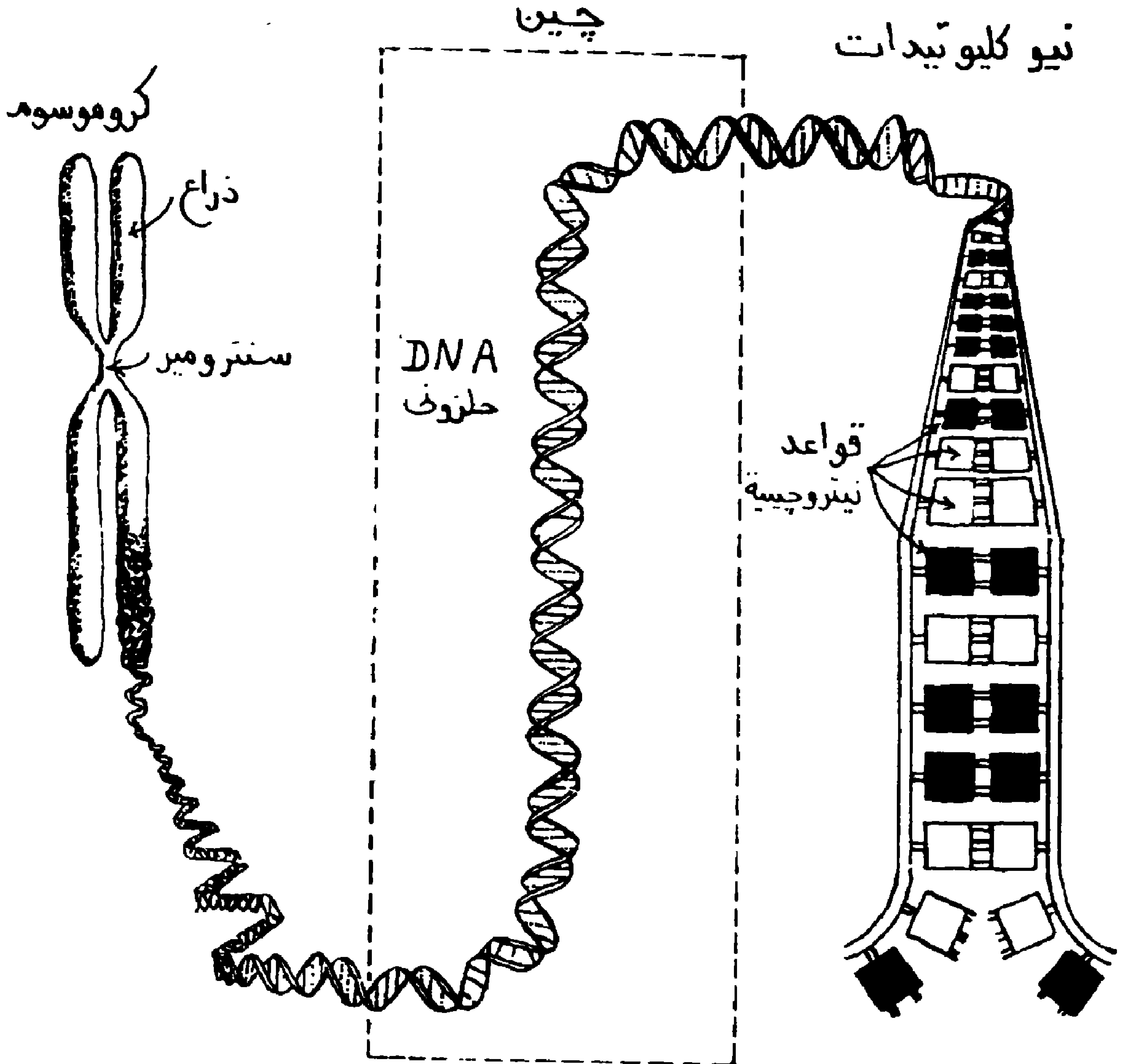


شكل ٧ جـ: عديدات الأمين التى ترتبط مع بعض أنواع الأحماض النووية.

حيث أن القواعد الإيدروجينية لا تتكون إلا بعد حدوث التفاعلات الكارهة للماء وطرد جزيئات الماء من بين حلزونى دنا. سنرى فيما بعد أن لحدوث الوظائف الحيوية لجزيىء دنا وللأحماض النووية لابد من حدوث فك لتركيب دنا ثنائى الحلزون. وأنه لحدوث هذا الفك بين قاعدتين a single paire of bases فإنه يلزم ١٠٠٠ كالورى لكل جزيىء. وبالطبع يحتاج دنا الذى يحتوى على آلاف من أزوج

القواعد لفكه unwind إلى كمية أكثر من هائلة من الطاقة. ولكن يجب أن نعلم أن فك دنا لا يحدث مرة واحدة بل يحدث تدريجياً على دفعات جزء صغير فى الوقت الواحد small section of the chain unwinds at a time. ولذلك فإن هذا الجــزء الصــغير الذى فك يلتحم مرة أخرى ويفك جزء صغير آخر تال له، وهكذا يتكرر ذلك. ولــذلك فإن اللخبطة disturbance فى تركيب الجزيىء تكون فى جزء صغير فقط بإســتمرار بالتتابع وليست فى كل الجزيىء. وهكذا فإن الطاقة اللازمة للفك لا تكون كبيرة حيث أن الطاقة تكون لفك جزء صغيرة ثم يلتحم ثم تستخدم طاقة فى فك جزء آخر صغير تال وهكذا تكرر العملية بإستمرار ولذلك يحتاج جزيىء دنا إلى جزء صغير من الطاقة اللازم لفك جزء صغير فقط. وهكذا يفسر ذلك كيف يتم تهيئة جزيىء دنا لتكــاثر أى لتكراره.

تحتوى النواة على صبغات أى كروموسومات كثيرة فى الإنسان والحيوان والنبات وهى تختلف فى عددها كثيراً فى الحيوانات والنباتات المختلفــة والكائنــات الحيــة الدقيقة ولكن عددها ثابت فى الإنسان. فى نبات الذرة ٢٠ كروموسوم وفــى القطــن المصرى ٥٢ كروموسوم وفى القمح ٤٢ كروموسوم وفــى قمــح المكرونــة ٢٨ كروموسوم. يتكون الكروموســوم عنــد بدايــة الإنقســام مــن كروماتيــدين two chromatids وهى عبارة عن نصفين طوليين للكروموســوم أى للصــبغى يتصــلان ببعضها فى الوسط بمنطقة تسمى السنترومير centromere. عند فــرد الكروماتيــد وحيث يكون حلزونى دنا ملتفان على بعضهما بشدة يصبحان حلزونين من دنا وكــل جزء من هذا الجزيىء دنا يكون عديد من النيوكلوتيدات والتى يتكون منها الجينــات فقد يكون الجين كبيرة الحجم فيتكون من عديد من النيوكليوتيدات أى عدد كبيــر أو يكون الجين صغير الحجم فيتكون من عدد قليل نسبياً من النيوكليوتيدات وهكذا فقــد يكون متوسط الحجم (شكل ٨).



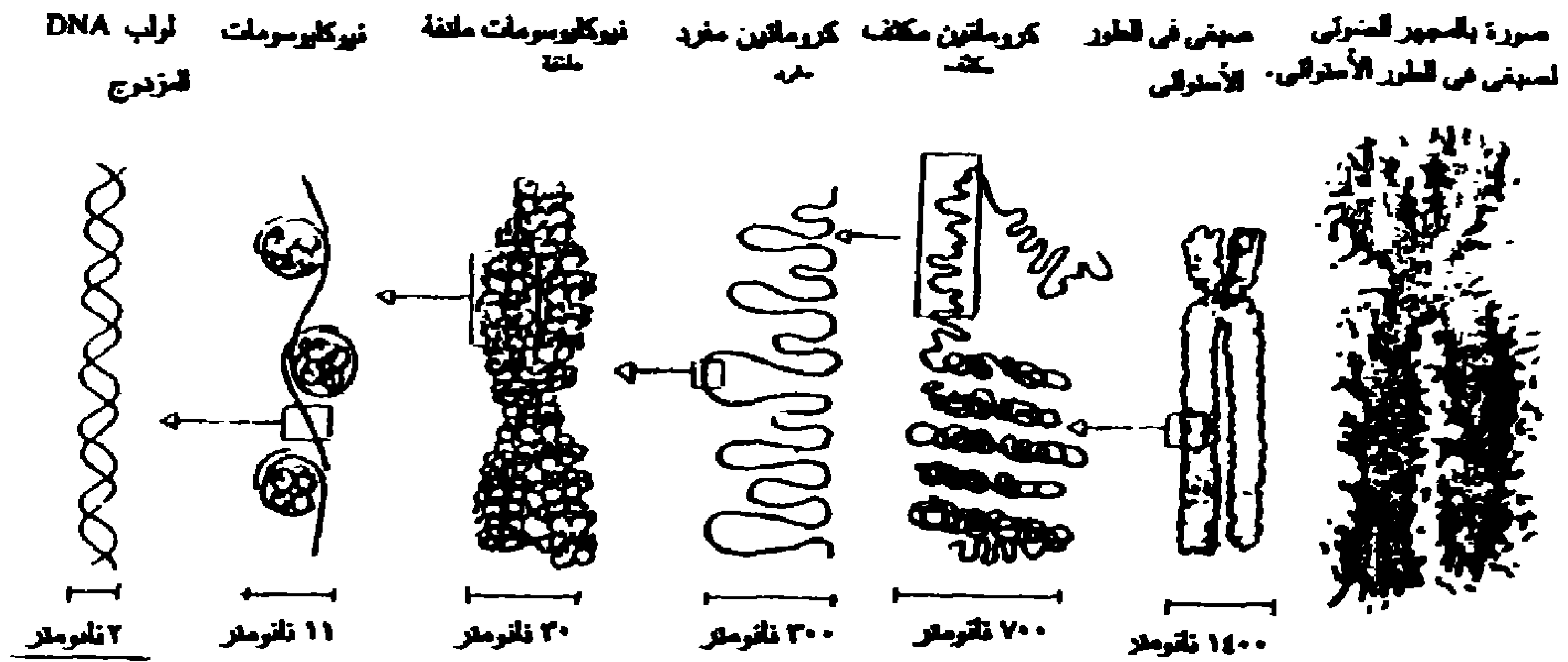
شكل ٨: الكروموسوم والجين و DNA.

يكون تركيب الكروماتيد من حيث إنطواء جزيىء دنا شديد فى الإنسان والحيوان والنبات والكائنات الحية الدقيقة وفيما يلى وصف ذلك بالتفصيل فى حالة كروموسومات الإنسان.

تحتوى الخلية الجسدية للإنسان على ٤٦ كروموسوم. فإذ تصورنا أنه أمكن فك اللولب المزدوج لجزيىء DNA فى كل صبغى ووضعت هذه الجزيئات على امتداد بعضها البعض لوصل طولها إلى ٢ متر، والهستونات وغيرها من البروتينات هى المسئولة عن ضم هذه الجزيئات الطويلة لتقع فى حيز نواة الخلية والتى يتراوح قطرها من ٢-٣ ميكرون، ولقد أوضح التحليل البيوكيميائى وصور المجهر الإلكترونى أن جزىء DNA فى الصبغى يلتف حول مجموعات من الهستون مكونا حلقات من النيوكليوسومات nucleosomes (شكل ٩) مما يؤدى إلى تقصير طول جزيىء DNA عشر مرات، إلا أنه يتعين أن يضم الجزيىء ويقصر حوالى ١٠٠,٠٠٠ مرة حتى تستوعبه النواة، ولهذا فإن حلقات النيوكليوسومات تلتف مرة أخرى لتضم مع بعضها ومع ذلك فإن كل ما سبق ليس بكاف لتقصير جزىء DNA إلى الطول الملاحظ، وأشرطة النيوكليوسومات الملتفة بشدة ترتب على شكل حلقة كبيرة بواسطة البروتينات التركيبية غير الهستونية للكروماتين. والكروماتين المتلف والمكدس بشكل كبير يشار إليه على أنه مكثف، وعندما يكون جزيء DNA على هذه الحالة لا تستطيع الإنزيمات أن تصل إليه، ويتعين فك هذا الالتفاف والتكدس على الأقل إلى مستوى شريط من النيوكليوسومات قبل أن يعمل DNA كقالب لبناء DNA أو RNA. عامة يعتبر الهستون أى بروتين الهستون كوسادة وظيفتها حماية جزيىء دنا فى النواة.

ما تم شرحه هو للكروموسوم العادى فى الإنسان والنبات والحيوان والكائنات الحية الدقيقة ولكن يوجد شكل وتركيب آخر مخالف للكرومسوم عما سبق شرحه يوجد فى البكتيريا، وسيتم شرحه بالتفصيل فيما يلى. وحيث أن البكتيريا تستخدم فى الهندسة الوراثية وأيضاً لأهمية عمليتى transformation و transduction فى الهندسة الوراثية وحيث أن لجدار خلية البكتيريا والغشاء البلازمى والكرومسوم البكتيرى دور فى ذلك من حيث نقل وتوطين الجينات genes cloning فسيتم شرحها بالتفصيل فيما يلى.

genes closing فسيتم شرحها بالتفصيل فيما يلى:

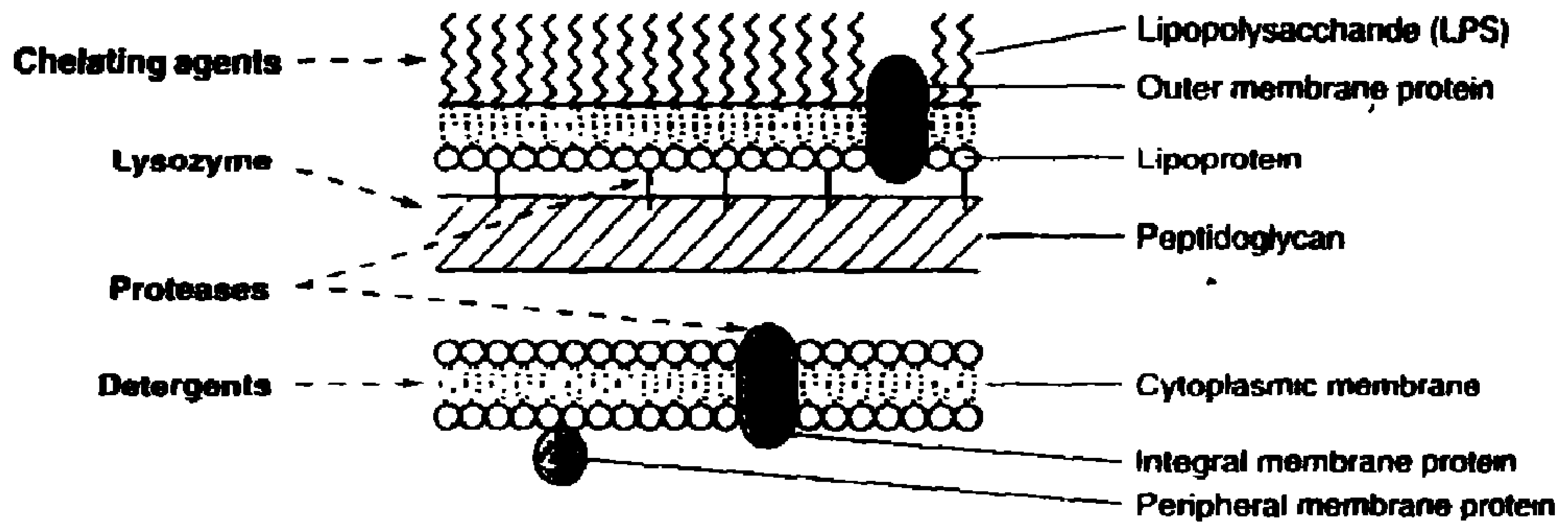


شكل ٩: الطريقة التي يغلف بها DNA في الكروماتين

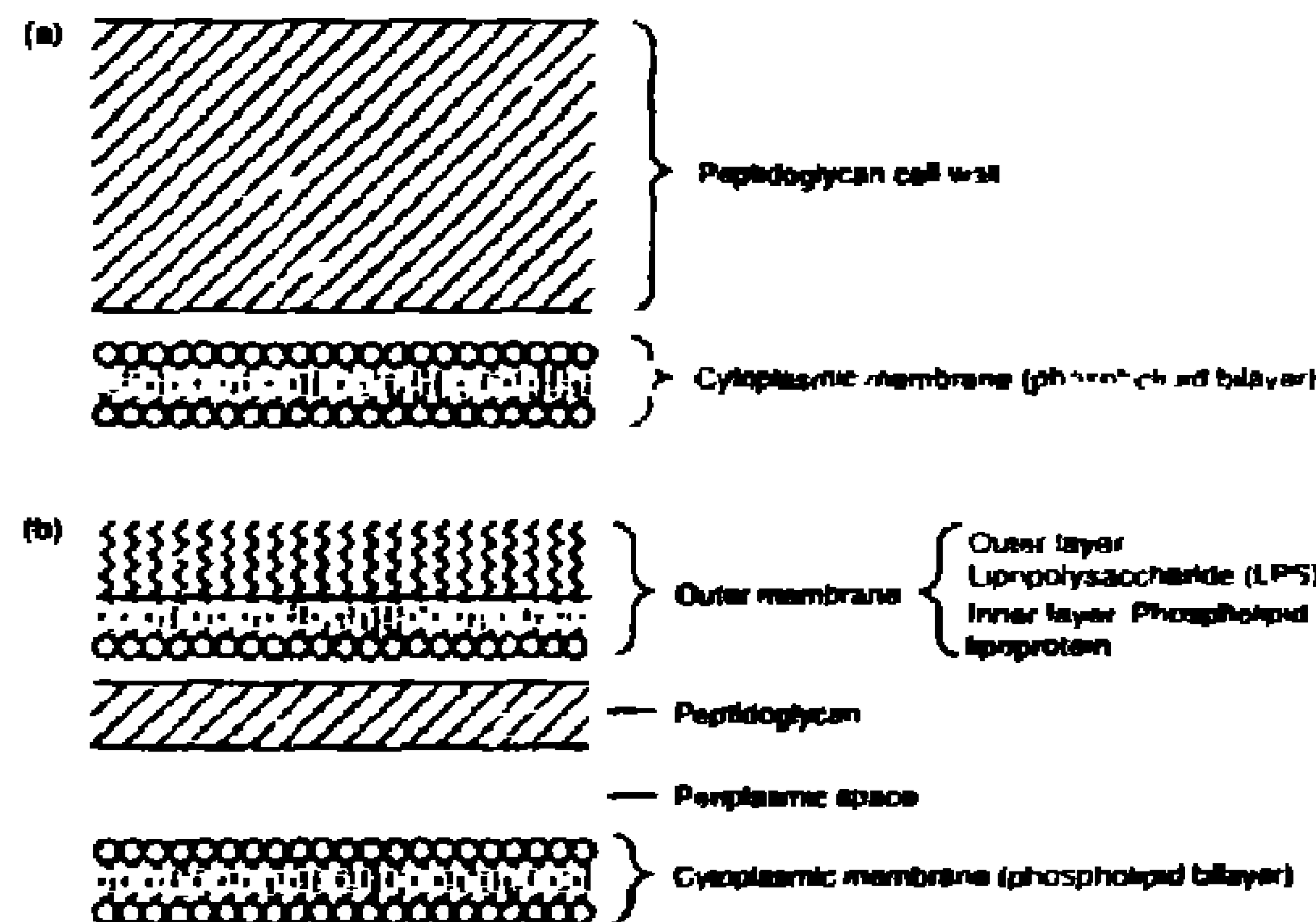
الجدار الخلوى والغشاء البلازمي البكتيري:

Bacterial Cell Wall and Plasms Membranes

تصنف البكتيريا إلى مجموعتين وهما سالبة لصبغة جرام وموجبة لصبغة جرام وذلك تبعاً لقابليتهم أى درجة إحتفاظهم بصبغة الكريستال البنفسجى اليودى Crystal violetiodine stain عند المعاملة بالكحول. تعتبر البكتيريت التى تحتفظ بهذه الصبغة موجبة لصبغة جرام والتى لا تحتفظ بهذه الصبغة سالبة لصبغة جرام. جدار خلايا البكتيريا السالبة لصبغة جرام مثل *E. coli*، و *S. typhimurium* أكثر تعقيداً من جدر خلايا البكتيريا الموجبة لصبغة جرام. تحاط البكتيريا السالبة لصبغة جرام بغشائين وهما الداخلى والخارجى ويفصل هذين الغشائيين منطقة سائلة تسمى الفراغ البريبلازمى periplasmic space. توجد أيضاً طبقة رقيقة بين هذين الغشائين وتسمى هذه الطبقة طبقة الببتيدوجليكان peptidoglycan. فى حالة البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بنقصها الغشاء الخارجى كما أن طبقة الببتيدوجليكان أكثر سمكاً مع عدم وجود فراغ بيريبلازمى (شكل ١١). يوجد منظر توضيحى لقطاع فى جدار خلية بكتيريا سالبة لصبغة جرام وأيضاً المواقع فى جدار الخلية التى تتأثر بالمركبات المخلبية chelating agents وأيضاً تتأثر بالإنزيمات المحللة للبروتين وأيضاً باالليزوزيم lysozyme والمنظفات detergents وهى موضحة بالأسهم المتقطعة (شكل ١٠).



شكل ١٠ : شكل تخطيطي (كاريكاتيرى cartoon) يبين جدار cell envelope لبكتيريا سالبة لصبغة جرام. المناطق القابلة للتأثير من الجدار بواسطة المركبات المخلبية والليـــزوزيم والبروتينيز والمنظفات detergents مشار إليها بالأسهم المتقطعة.



شكل ١١ : شكل تخطيطي (كاريكاتيرى cartoon) يبين الفروق الرئيسية بـــين جـــدار الخلايا الموجبة لصبغة جرام (a) والسالبة لصبغة (b).

طبقة الببتيدوجليكان والتى يمكن رؤيتها كطبقة سميكة خارجية فى حالة البكتيريا الموجبة لصبغة جرام تتكون من بلمرة كل من وحدات سكر ووحدات ببتيد. يتم ربـــط السلاسل عديدة التسكر عرضياً بواسطة روابط عرضية أى يتقـــاطع معهـــا عرضـــياً مركبات خماسية الببتيد أى ذات خمـــس جزيئـــات مـــن الجليســـين pentaglycine

peptide. والتركيب العام لطبقة الببتيدوجليكان هو عبارة عن طبقة مغلقة على نفسها تماماً لتكوين جزيء واحد كبير شبيه بالكيس one enormous saclike macromolecule يحيط ويغلف تماماً الغشاء الداخلى والسيتوبلازم فى خلية البكتيريا. تحدد طرق التقاطع العرضى cross-linking pattern للجزيئات السابقة أى الإختلافات فى أشكال ونظم التقاطع العرضى فى طبقة اللتيدوجليكان شكل كل نوع بكتيرى.

تعتبر طبقة الببتيدوجليكان هى الطبقة القابلة للتحلل بالإنزيم ليسوزيم lysozyme لأنها الطبقة الوحيدة الصلبة فى الجدار الخلوى. لذلك فإن معاملة أشكال مختلفة من البكتيريا مثل البكتيريا العصوية والكروية وغيرها من الأشمال بهذا الإنزيم يسبب تحلل الجدار وتصبح خلية البكتيريا كروية الشكل فى جميع الحالات السابقة وتسمى خلية البكتيريا المعاملة بهذا الإنزيم وذات الشكل الكروى بإسم البلاست الكروى sphaeroplast، أما عن آلية عمل البنسلين فإنه يتداخل مع تخليق الببتيدوجليكان أى اثناء تخليق الببتيدوجليكان أثناء نمو وكبر خلايا البكتيريا فى الحجم ولذلك تكون طبقة الببتيدوجليكان رقيقة جداً وضعيفة جداً أو حتى غير مكتملة التكوين ولذلك تصبح خلية البكتيريا النامية محاطة بجدار غير صلب أو حتى غير موجود ولذلك تكبر الخلية فى الحجم أى تنتفخ ويستمر الإنتفاخ حتى تنفجر الخلية ولذلك فإن البنسلين يقتل الخلايا النامية فقط دون الخلايا المسنة الغير نامية.

أما الغشاء السيتوبلازمى المبطن لجدار الخلية من الداخل والذى يسمى فى خلايا النبات بإسم البلازما ليما plasmalemma أو الإكتوبلاست ectoplast فإنه عبارة عن حاجز أسموزى والذى يتحكم فى نوع الجزيئات الخارجة والداخلة لخلية. إنتقال أو مرور الجزيئات عبر الغشاء يحتاج إلى جهاز ناقل transport system. بعض الجزيئات لا تدخل إلى الخلية لنقص فى جهاز النقل ومثال ذلك أن الغالبية العظمى من الجزيئات المفسفرة مثل النيوكليوتيدات لا يمكنها دخول الخلية. وجد أن معاملة خلايا البكتيريا بالتلوين وهو مذيب للدهون يسبب فساد دهون الغشاء السيتوبلازمى (الغشاء السيتوبلازمى يتكون من دهون وبروتين) وبالتالى فساد نفاذية الغشاء

السيتوبلازمى وفساد تحكم فى النفاذية. ولذلك تسمى الخلايا المعاملة بالتلوين خلايا مستحثة النفاذية permeabilized. هذه الخلايا مستحثة النفاذية لا يمكنها أن تنمو أو تنقسم ولكن يمكنها أن تقوم بكثير من التفاعلات الكيموحيوية. ومثال ذلك أن الخلايا مستحثة النفاذية تستعمل فى دراسة تخليق دنا حيث أن هذه الخلايا تسمح بنفاذية مركب deoxynucleoside triphosphate وهو المركب الأصل percurosor الذى يتكون من دنا مباشرة ومع العلم بأن الخلايا العادية لا تسمح بنفاذية ومرور المركب المذكور. وجد أيضاً أن الخلايا المستحثة مناسبة وملائمة ومفيدة فى دراسة الإنزيمات ومثال ذلك دراسة تخليق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز β-galactosidase والذى يعتبر مثال واضح لكيفية تنزيم تعبير الجين عن نفسه أى عن وظيفته regulation of gene expression. يتم عمل ذلك عادة بإستخدام خلايا مستحثة قبل إضافة مادة تفاعل ملونة chromogenic substrate.

يعتبر الغشاء الخارجى outer membrane للبكتيريا السالبة لصبغة جرام معقد التركيب. حيث أن الجزء الداخلى من الغشاء والذى يتكون من طبقة مزدوجة من الدهون الفوسفورية والبروتين phospholipids-protein bilayer يكون مغلف بواسطة مركبات عديدة التسكر دهنية lipopoly saccharides. يوجد للمركبات الأخيرة دور وقائى للخلية حيث نها تعطى أى تكون سطح محب للماء والذى يحمى الخلية من المركبات الكارهة للماء مثل أملاح المرارة والمنظفات detergents. يحتوى الغشاء الخارجى نوع من البروتين يسمى بورينات porins والتى تكون ثقوب تسمح بدخول الجزيئات المحبة للماء الصغير الحجم ولكنها تمنع دخول الجزيئات الكبيرة الحجم مثل كثير من المضادات الحيوية.

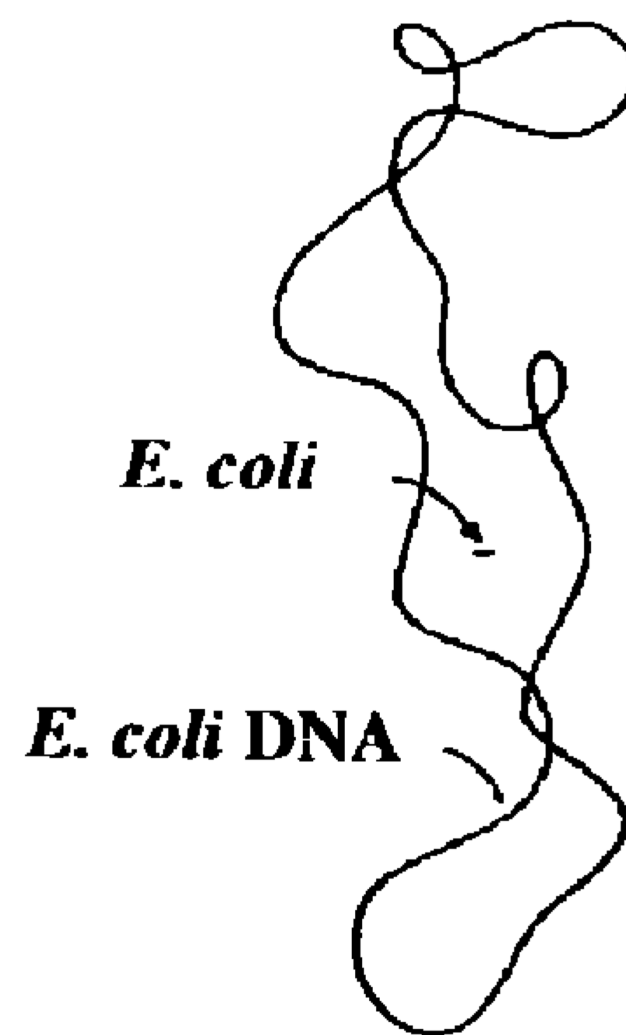
يوجد بين الغشاء الخارجى والغشاء الداخلى فى الجدار منطقة مائية aqueous region تسمى منطقة الفراغ البريبلازمى periplasmic space. يتركز كثير من البروتينات فى منطقة الفراغ البريبلازمى. تشمل هذه البروتينات إنزيمات nucleases و proteases والتى تسبب كسر وتحطيم المركبات الكبيرة الحجم الغير قابلة للنفاذية

وبذلك يصغر حجمها وتصبح قابلة للمرور والنفاذية عبر الغشاء السيتوبلازمى أيضاً. تشمل هذه البروتينات أيضاً علاوة على الإنزيمات بروتينات ترتبط بأيونات معينة أو سكريات معينة أو أحماض أمينية ويمكن أن تسمى هذه البروتينات حاملات أو ناقلات الأيونات أو ناقلات الجزيئات **ions or molecules carriers**. هذه البروتينات الناقلة تسهل من نفاذية ومرور الأيونات والجزيئات عبر الغشاء الداخلى أى الغشاء السيتوبلازمى.

الكروموسوم البكتيرى

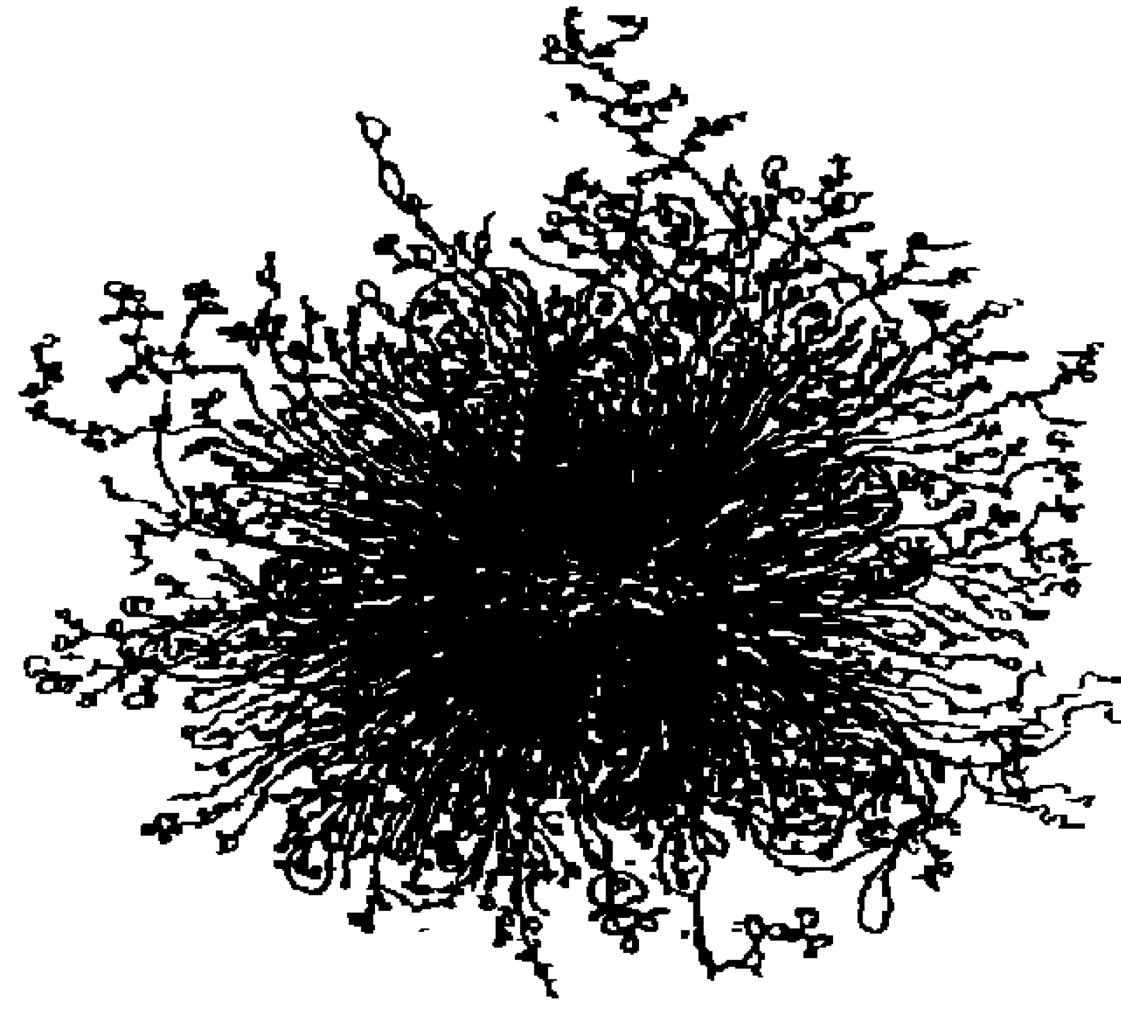
Bacterial Chromosome

كروموسوم البكتيريا إيشيريشيا كولاى *E. coli* والبكتيريا *Salmonella typhimurium* وغالبية البكتيريات الأخرى عبارة عن جزيىء دنا حلقى ثنائى الخيط أى الشريط أى الحلزون **ds DNA** مفرد الحلزنة المتميزة **single supercoiled**. يتكون الكروموسوم فى *E. coli* من حوالى ٤,٧ × ١٠^٦ زوج قواعد **bp**. وعند فرد هذا الكروموسوم يصل طوله إلى ١ مم ن الفورمة لدنا (**Bform DNA**) وذلك بالرغم من أن طول خلية البكتيريا يتراوح بين ١-٢ ميكرومتر ولذلك فإن لابد من أن يصبح مكثف ومركز وذلك بإنطوانه على نفسه ألف مرة ليصبح ملائم لأن يوجد بداخل الخلية البكتيرية (شكل ١٢).



شكل ١٢: مقارنة بين حجم خلية إ. كولاى ودنا إ. كولاى.

عند عزل دنا من خلية البكتيريا وبطريقة خاصة معينة وذلك لتفادى كسر دنا وأيضاً تفادى دنترة أو فساد البروتين فإن دنا يكون موجود فى شكل مندمج مكثف يسمى شبيه النواة nucloid أو الجسم النووى nuclear body (شكل ١٤). يتكون شبيه النواة من جزيىء دنا واحد وبروتين ورنا. يمكن تصوير شبيه النواة بالمجهر الإلكترونى (شكل ١٣) ويتضح من الشكل خاصيتين أو ميزتين هامتين وهو أن دنا يتميز بوجود نتواءت عقدية كثيرة loops، أن كل نتوء عقدى زائد الحلزونية المتميزة supercoiled. تتكون شبيه النواة من جزء كثيف يبدو أنه جزيىء دنا السابق وصفة وملتحم ومتواجد معه بروتينات ورنا خاصة فى المركز.



شكل ١٣: صورة بالمجهر الإلكترونى لكروموسوم البكتيريا إ. كولاى والذى يوضح عديد من النتوءات والعقد loops والتى تشتق من منطقة مركزية central region.

عند عمل قطع واحد فقط فى خيط واحد فقط فى جزيىء دنا بواسطة إنزيم DNase يسبب إرتخاء وعدم وجود حالة الحلزنة المتميزة nonsupercoiled. حيث أن دنا العادى يتميز بحالة الحلزنة المتميزة كما سبق وصفه. وحيث أن القطع nick يسبب إرتخاء نتيجة للدوران الحر free rotation للطرف المقطوع. مع كل قطع فإن حلزنة متميزة واحدة تنفك أى مع القطع الواحد يفك نتوء عقده واحد فقط. يحتاج شبيه النواة إلى خمسون قطع قبل أن يصبح حلقة مفتوحة. معنى ذلك أن كل نتوء ذو حلزنة متميزة مستقلة. تركيب شبيه النواة الذى تم إستنتساخ تركيبه بهذه الطريقة يمكن توضيحه فى الشكل (شكل ١٥).

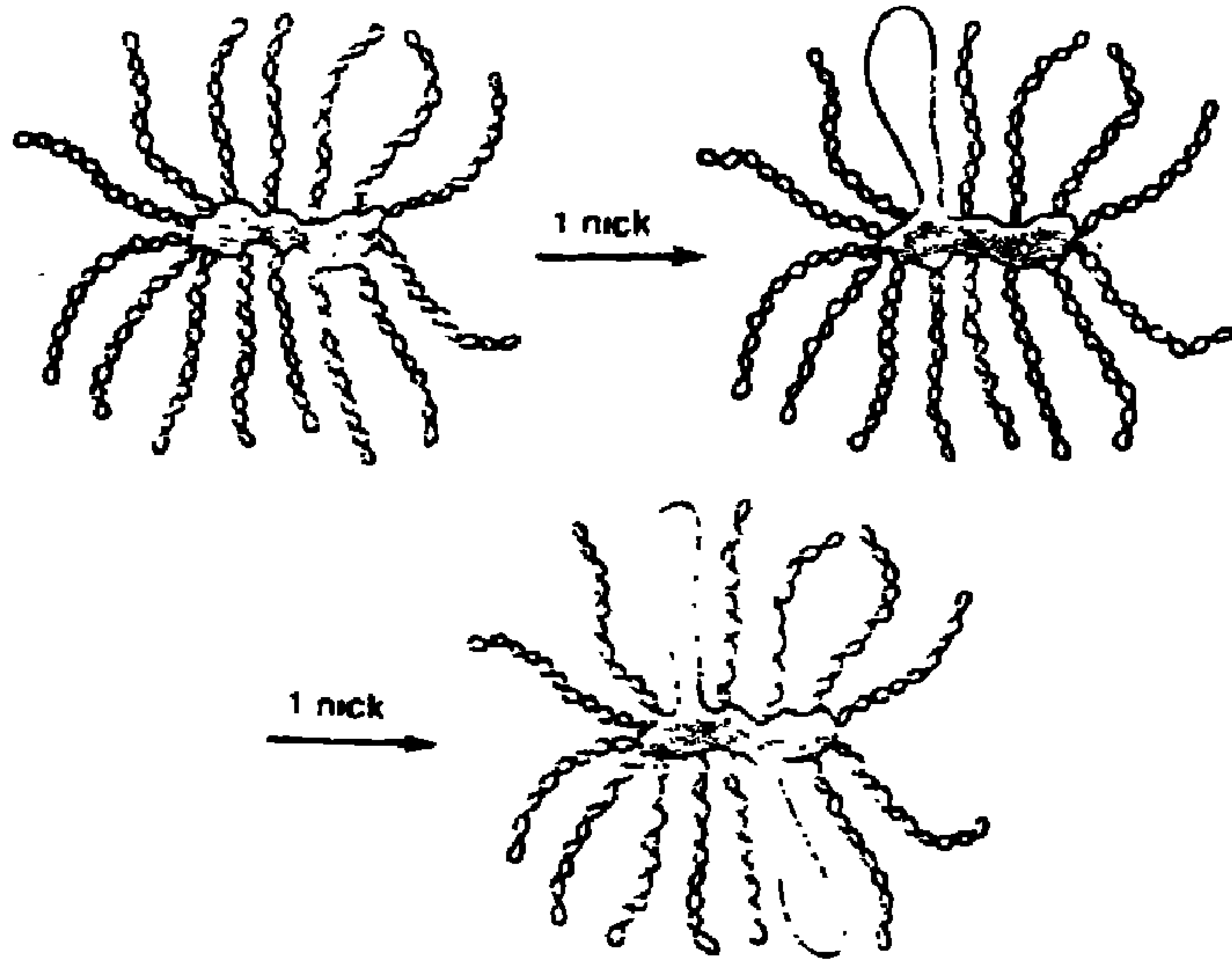


شكل ١٤ : خلايا البكتيريا بها شبه النواة **nucloid**.

نهاية كل نتوء عقدى ذات حلزنة زائدة تلتصق بالبروتين بطريقة معينة وتكون مستقلة عن نهايات الحلقات المجاورة حيث أن فك الحلقة الواحدة لا يؤثر على فك الحلقات المجاورة ولذلك يلزم قطع لكل نتوء عقدى **loop** فإذا تم عمل قطع واحد يحدث فك النتوء لعقده واحدة ولا يؤثر على فك العقد المجاورة ولذلك عند عمل قطع غضافى يحدث فك لنتوء عقدة ثانية وهكذا ينتج عن كل قطع فك نتوء عقدى. ومن ذلك يتضح أن تركيب شبيه النواة أن كل عقدة غير متصلة أو معزولة عن العقد الأخرى بطريقة معينة.

درجة الحلزنة المتميزة فى دنا البكتيريا محكوم تمامًا وثابت ولا يحدث إعتباطياً أى أن الحلزنة المتميزة تقع تحت تأثير خلية البكتيريا وهى صفة خاصة بالبكتيريا مثل الصفات الأخرى الخاصة بالبكتيريا. وجد أن الإنزيم دنا جيريز **DNA gyrase** والذى له دور مؤثر فى عملية تخليق دنا هو المسئول أيضاً عن عملية الحلزنة المتميزة. يسبب إنزيم دنا جيريز حلزنة متميزة سالبة الإلتفاف **negative superhelical twists** لجزيىء دنا الحلقى المغلق **covalently closed circular DNA**. وجد أن المضاد الحيوى كومرميسين **coumermycin** يثبط إنزيم دنا جيريز الموجود بداخل البكتيريا ***E. coli***. عند إضافة كومرميسين إلى مزرعة من بكتيريا ***E.***

coli فإن الكروموسوم يفقد حالة الحلزنة المتميزة بسرعة. يوجد إنزيم عكسى لإنزيم دنا جيريز وهو إنزيم توبوأيزوميريز رقم ١ (topoisomerase-1) ووظفته إزالة الحلزنة المتميزة. وفى حالة التجارب المعملية *in vitro* يمكن لهذا الإنزيم النقى أن يفك الحلزنة المتميزة لجزيىء دنا. وجدت طفرات من البكتيريا ينقصها نشاط هذا الإنزيم وتسمى هذه الطفرات *top* A. وجد أن شبيه النواة فى هذه الطفرات يحتوى على زيادة فى الحلزنة وتصل الزيادة حوالى ٣٢% عن المعتاد. وهذه الطفرات يحدث لها طفرات ثانوية بسرعة عادة secondary mutations فى الجينات الخاصة بإنزيم دنا جيريز، وهذه الطفرات تؤثر بدرجة بسيطة على نشاط إنزيم جيريز وبذلك تصبح درجة الحلزنة المتميزة فى جزيىء دنا عادية أى بالدرجة العادية. وجد من الدراسات العديدة أن إظهار تأثير الجين أى إظهار صفة الجين تتأثر بالحلزنة المتميزة. يوضح ذلك أن ثبات حالة الحلزنة المتميزة فى خلية البكتيريا، وكما سبق القول أنها محكومة تماماً وثابتة تماماً، هامة لظهور صفات الجينات.



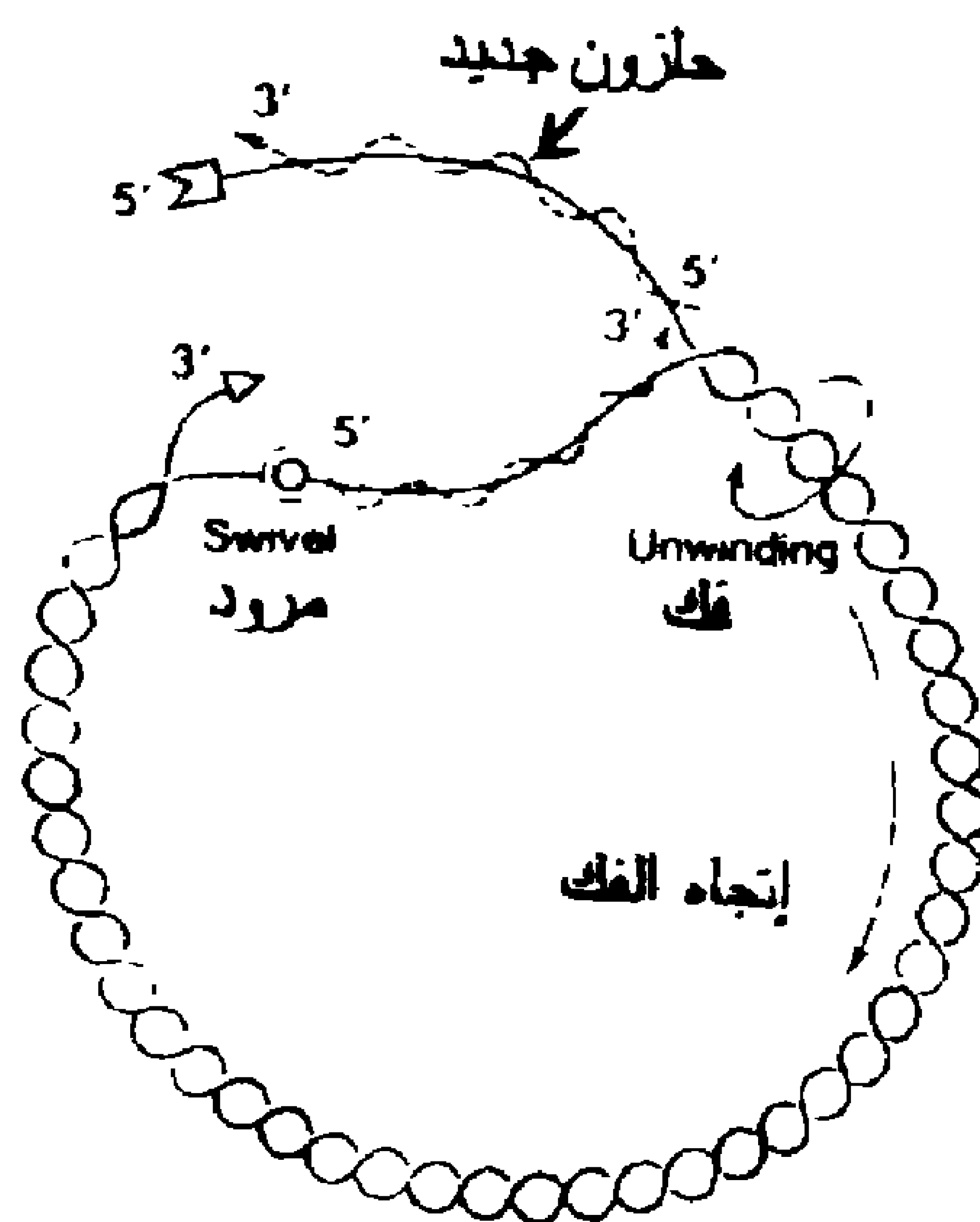
شكل ١٥: شكل تخطيطى للكروموسوم البكتيرى ذو النتوءات العقدية الزائدة الحلزنة يوضح ١٥ نتوء عقدى زائد الحلزنة (المعتاد أن يوجد فى الكروموسوم للبكتيريا إ. كولاى ٤٠-٥٠ نتوء عقدى زائد الحلزنة) ملتصقة بالبروتين (الجزء المركزى) بطريقة ما غير معروفة تماماً. يمكن فتح النتوء العقدى الواحد الزائد الحلزنة بقطع واحد وهكذا الشكل به قطعتين وبالتالى به نتوئين فقدا حالة اللولبة والحلزنة الزائدة.

أما عن طريقة إنقسام الكروموسوم البكتيرى فى البكتيريا *E. coli* فقد تمكن كيرنس Cairns عام ١٩٦٣ من وضع أسس إنقسام هذا الكروموسوم. حيث أن تضاعف الكروموسوم يبدأ عند منطقة معينة فى محيط الكروموسوم ثم يحدث فك لحلزونى الكروموسوم تدريجياً حتى يتم تضاعف الكروموسوم تماماً. وملخص هذه العملية أنه يحدث كسر فى أحد حلزونى DNA عند منطقة معينة تسمى منطقة البداية initiation site ثم يحدث فك لحلزونى DNA تدريجياً وفى نفس الوقت يتضاعف DNA (شكل ١٦).

أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء أنقسام الخلايا تنفصل شبه الأنوية المنقسمة أى المادة النووية عن بعضها أى تبتعد عن بعضها. يلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيوان العادية eukaryotes. حيث أن أنفصال الكروموسوم فى خلايا النبات العادية أثناء الأنقسام يحدث نتيجة لأتصال سنترومير الكروموسوم ببعض خيوط المغزل وهى عبارة عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكمش هذه الخيوط أو الأنابيب فى أتجاه أحد قطبى الخلية وبذلك تبتعد الكروموسومات عن بعضها متحركة فى أتجاه أحد قطبى الخلية أثناء الطور الأنفصالى. هذه الخيوط وهذه الأنابيب غير موجودة فى الخلية البكتيرية فكيف يحدث الأنفصال بين الكروموسومين فى الخلية البكتيرية؟. وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب وبرينر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin عام ١٩٦٣ نظرية التضاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيرى (شكل ١٧) وهى كما يلى:

١ – عندما يبدأ تضاعف الكروموسوم البكتيرى فإن منطقة معينة specific site على محيط الكروموسوم ترتبط بمنطقة معينة على الميسوسوم mesosome تسمى منطقة التضاعف replicator site. يتكون الميسوسوم نتيجة لأنبعاج غشاء الخلية المبطن للجدار للداخل cell membrane كما أنه يتداخل مع بعضه مرات عديدة ليكون كتلة من الأغشية تسمى الميسوسوم. وفى منطقة

التضاعف تنشط الإنزيمات المسئولة عن كسر وتضاعف حلزونى DNA مثل إنزيم بلمرة الـ DNA polymerase DNA. وفى هذه الأثناء ينكسر أحد حلونى DNA عند الموقع ´5 إلى ´3 وتعمل منطقة التضاعف replicator site على فك حلزونى DNA مبتدئاً من مكان الكسر أو القطع ويزداد تدريجياً على طول الكروموسوم. تعمل منطقة التضاعف فى هذه الحالة كمرود swivel.



شكل ١٦: تضاعف DNA حلقى، الخط العادى حلزون DNA قديم، الخط المتقطع حلزون DNA جديد.

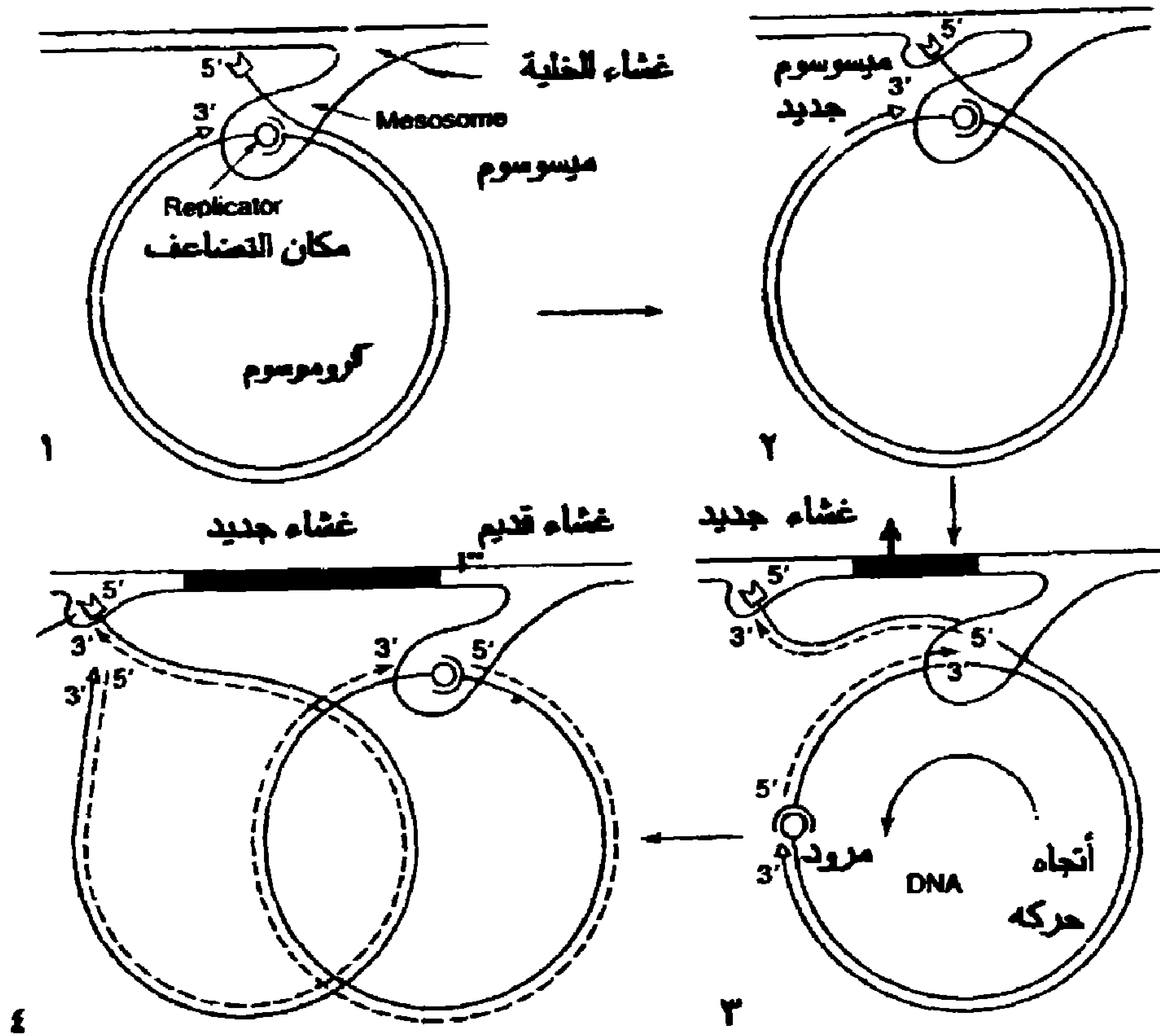
٢ – بعد قطع أحد حلزونى DNA فإن أحد طرفى الحلزون المقطوع ´5 يتصل بمنطقة تضاعف أخرى مجاورة لمنطقة التضاعف الأولى وذلك قبل حدوث تضاعف لحلزونى DNA. أى يحدث الألتحام بين الطرف المقطوع ومنطقة التضاعف قبل بدء حدوث التضاعف.

٣ – تحدث بداية فك حلزونى DNA فى منطقة التضاعف. وأن التفاعل المسئول عن فك حلزونى DNA يبدأ من منطقة التضاعف وأيضاً الإنزيمات المسئولة

عن تضاعف حلزونى DNA أثناء الأنفصال تبــدأ مــن منطقــة التضـــاعف replication fork. وأثناء عملية فك وتضاعف DNA يتحرك الكروموســوم حركة دائرية فى عكس أتجاه عقــارب الســاعة. وتتحــرك أيضــاً منطقــة التضاعف والتى تعمل كمرود ويتضاعف الكروموسوم.

٤ – ينفصل الكروموسومين عن بعضهما نتيجة لتخليق أجزاء فى الغشــاء بــين موضع الألتصاق الأول وموضع الألتصاق الثــانى الجديــد. أى أن الغشــاء يستطيل بين موضعى الالتصاق ويتباعــد الكروموســومان الجديــدان عــن بعضهما.

أمكن إثبات كثير من خطوات هذه النظرية فيما بعد. حيث أمكن بواسطة المجهــر الإلكترونى إثبات إلتصاق منطقة معينة على الكروموسوم بغشاء خلية البكتيريا. أمكن أثبات أيضاً وجود إرتباط كبير بين غشاء خلية البكتيريا و DNA المخلق الجديد وذلك بإستعمال DNA مشع حيث يتم تعليم الثيميدين thymidine tritiated. وجد أيضاً أن إنزيم بلمرة DNA أى DNA polymerase مرتبط بأغشية خلية البكتيريا.



شكل ١٧ : تضاعف الكروموسوم البكتيرى.

١ – إتصال الكروموسوم بغشاء الخلية ومكان التضاعف وكسر أحد حلزونى دنا.

٢ – إتصال أحد طرفى الحلزون المقطوع ´5 بغشاء الخلية فى منطقة ميسوسوم جديدة.

٣ – فك حلزونى دنا وحركة الكروموسوم فى إتجاه عكس عقارب الساعة وبناء حلزونين جديدين. الحلزون القديم بخط عادى والحلزون الجديد بخط متقطع. كبر مساحة سطح الغشاء وهى منطقة غامقة.

٤ – تكوين كروموسومين جديدين مع كبر مساحة سطح الغشاء وبذلك تزداد المسافة بين الكروموسومين (منطقة غامقة).

دراسة على الأحماض النووية

جميع الصفات أى المعلومـات الوراثيـة hereditary information توجـد فـى الأحماض النووية. فى كثير من الكائنات الحية تتكون الجينات من أجـزاء مـن دنـا DNA ولكن فى قليل من الفاجات وبعض الفيروسات النباتية والحيوانية يعتبـر رنـا RNA هو المادة النووية للجينات.

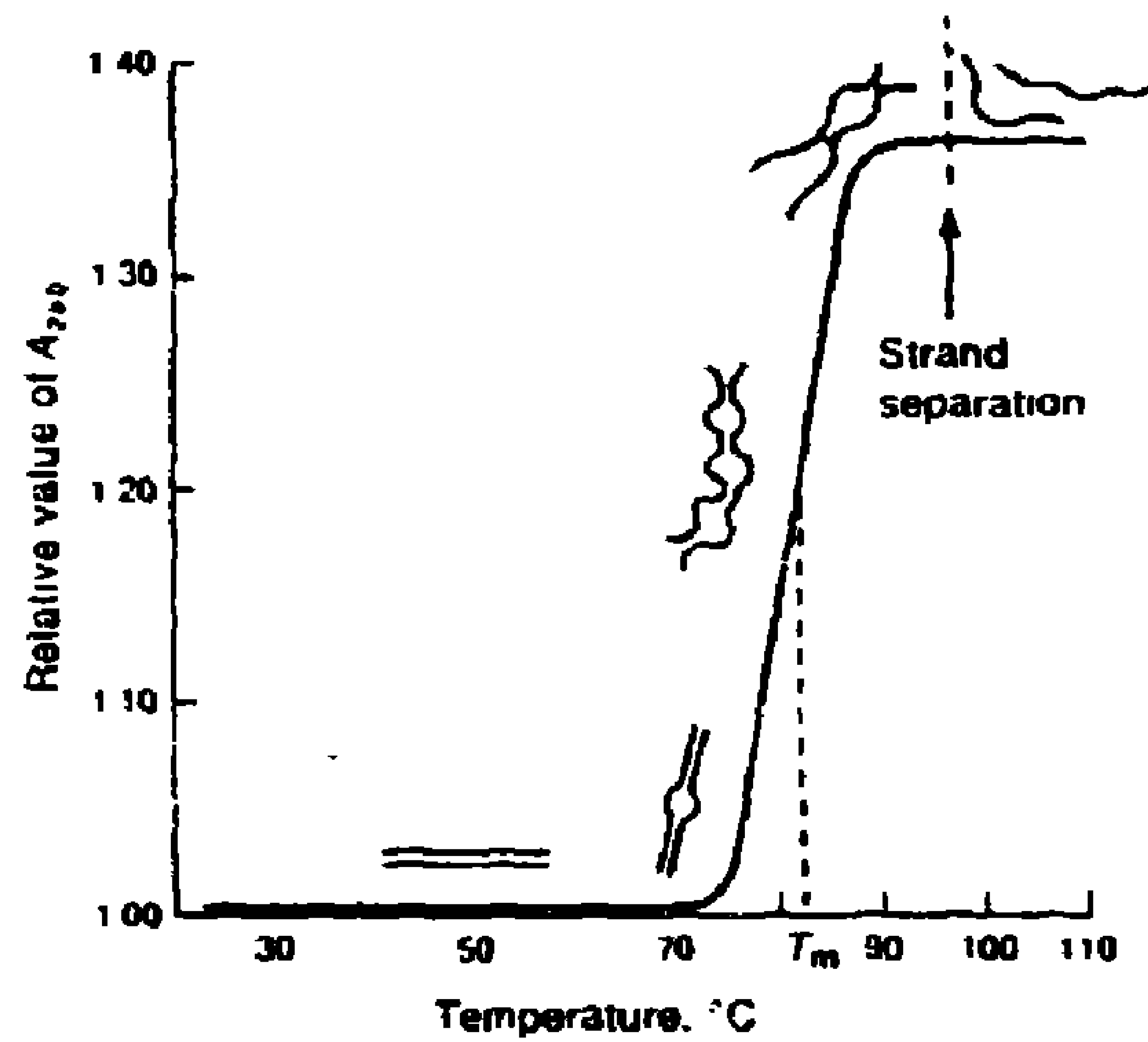
الدنترة ومنحنيات الإنصهار

Denaturation and Melting Curves:

تعتبر الروابط الإيدروجينية التى تصل بين أزواج قواعد دنا DNA فى حلزونى دنا ضعيفة ومن السهل كسرها بالحرارة. عند كسر الروابط فإنه يحدث دنترة لدنا. دنترة ترجمة عربية لكلمة denatured. عندما تكون الروابط الإيدروجينية سليمة يسمى دنا عادى أو طبيعى native وهو عبارة عن دنا العادى الموجود فـى الطبيعـة والـذى يتكون من حلزونى دنا. تسمى عملية التحول من الحالة العادية إلـى حالـة الـدنترة بعملية الدنترة denaturation. عند تسخين دنا طبيعى وكسر الروابط الإيدروجينيـة فإن حلزونى دنا ينفصلان عن بعضهما ولذلك فإن دنا يصبح خيوط منفـردة سـائبة ويكون فى هذه الحالة مدنتر denatured DNA is single-stranded.

كثير من المعلومات عن تركيب دنا وردجة ثابته أمكن التعرف عليهـا بواسـطة عملية الدنترة ودراسة عملية الدنترة، ومن أمثلة ذلك أن دنا يمتص الأشـعة فـوق البنفسجية عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر. وقد وجد أن الخيوط المنفـردة مـن دنـا تمتص الأشعة فوق البنفسجية عند هذا الطول بدرجة أشد من دنـا الطبيعـى. عنـد دراسة تأثير درجة الحرارة على دنترة دنا ورسم ذلك على منحنى يسمى هذا بمنحنى الإنصهار melting curve (شكل ١٨). عند بداية المنحنى يكون حلزونى دنا عاديين وبالتسخين ينفك حلزونى دنا تدريجياً نتيجة لكسر الروابط تدريجياً فكلما زادت درجة الحرارة كلما زاد فك حلزونى دنا وكسر عدد أكبر من الروابط. وعند درجة الحرارة

الحرجة critical temperature فيها يتم كسر آخر رابطة تربط الحلزونين عند قمة المنحنى وتصبح الخيوط شائبة ومنفصلة تماماً. تعريف درجة حرارة الإنصهار هو عبارة عن درجة الحرارة والتى يحدث عندها درجة الإمتصاص الكلية للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر (A_{260} أى Absorbance). تسمى T_m درجة حرارة الإنصهار melting temperature تسمى التجارب السابقة بتجارب الإنصهار melting experiments. تتصل القاعدتين AT برابطتين إيدروجينيتين بينما تصل القاعدتين GC بثلاثة روابط إيدروجينية ولذلك فإن فصل القاعدتين GC يحتاج دجرجة حرارة أعلى عنه فى حالة فك القاعدتين AT. ولذلك فإن قيم T_m تتوقف على تركيب دنا. يلاحظ أن التسخين فى هذه التجارب تدريجى وهين.



شكل ١٨: منحنى الإنصهار لدنا يوضح قيمة Tm والتغيرات المختلفة فى الشكل لدنا فى درجات إنصهار مختلفة.

فى حالة المحاليل القياسية من حيث تركيز الأملاح ودرجة pH فإنه يمكن إستعمال T_m كمقياس لتركيب القواعد. فى درجة pH عالية فإن شحنة كثير من المجاميع المستعملة فى عمل الروابط الإيدروجينية تتغير وبذلك تمنع القواعد من تكوين الروابط الإيدروجينية وفى pH أكبر من ١١,٣ فإن جميع الروابط الإيدروجينية يحدث لها فك ويحدث لجزيئات دنا دنترة كاملة. كما فى درجات الحرارة

العالية و pH متعادل فإنـــه يحـــدث كســـر للـــروابط الفوســـفورية ثنائيـــة الإســـتر phosphodiester bonds والتى تصل بـــين الســـكر والقاعـــدة. وجـــد أن الرابطـــة الفوسفورية مقاومة تماماً للتحلل القلوى ولذلك فإن المعاملة على درجة pH عاليـــة تسبب لك الحلزونين وأنفصالهما أى عملية الدنترة كسر الروابط التعاونية أى الروابط الفوسفورية ثنائية الإستر.

عند تبريد محلول دنا المدنتر بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة أو عند تغييـــر pH محلول دنا المدنتر بواسطة القولية العالية من pH عال إلى pH متعادل فإن خيـــوط الحلزونات تستمر سائبة منفصلة. عندما يكون تركيز الملح فى المذيب منخفض فإن الشحنة السالبة لمجاميع الفوسفات تحافظ على الحلزونات شائبة منفصلة مســـتقيمة غير ملفوفة والعكس صحيح فى تركيز الملح المرتفع حيث يسبب معادلة للشـــحنات السالبة ولذلك فإن الحلزونات تصبح غير مستقيمة وتلتو وتلتـــف حلزونيـــات علـــى نفسها لتكون جزيىء مندمج compact نتيجة لتكون روابط بين قواعد حلـــزون دنـــا intrastrand base pairing.

وحيث أن تماثل تتابع القواعد فى حلزون دنا المتكون لا يكون طويل إلا فى حالات نادرة ولذلك فإن الأجزاء من دنا المتوافقة والمرتبطة ببعضها بواسطة روابط نـــادراً ما تزيد عن عشرة نيوكليوتيدات.

إنعكاس الدنترة

Renaturation

يمكن معاملة محلول من جزيئات دنا مندنترة بطريقة معينة بحيث أن جزيئات أى حلزونى دنا المنفصلة يعاد إتصالها وإرتباطها ليتكون جزيىء دنا طبيعى عاد native مرة أخرى. تسمى هذه الطريقـــة annealing ويفضـــل تســـميتها renaturation أو reannealing. تعتبر إنعكاس الدنترة أداة هامة فى وراثة الكائنات الحية الدقيقة حيث أنها تستعمل بكثرة فى الهندسة الوراثية كمقياس لدرجة القرابة بين الكائنات الحيـــة

الدقيقة كما أنها تستعمل أيضًا فى هذا الصدد فى النباتات الزهرية وذلك لإيجاد درجة القرابة بين البسلة والحمص والفاصوليا حيث وجد أن درجة القرابة بين البسلة والحمص أكبر منه بين درجة القرابة بين الحمص والفاصوليا وذلك فى العائلة البقولية فى العائلة النجيلية فقد وجد أن درجة القرابة بين القمح والرى أكبر من درجة القرابة بين الشعير والراى. تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى دراسات الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية. فهى بذلك تستخدم للتعرف على نوع معين من رنا RNA أو أنواع معينة من رنا وتستعمل أيضًا لتحديد تتابع قواعد معينة فى جزيئ دنا. لكى تحدث حالة إنعكاس الدنترة لابد من وجود الشروط الآتية:

١ – يجب أن يكون تركيز الملح كبير بحيث أن الطرد أو التنافر الإلكتروستاتيكى electrostatic repulsion بين الفوسفات فى الحلزونين يتوقف وعادة يكون تركيز الملح أى كلوريد الصوديوم يتراوح بين ٠,١٥ إلى ٠,٥ جزيئى.

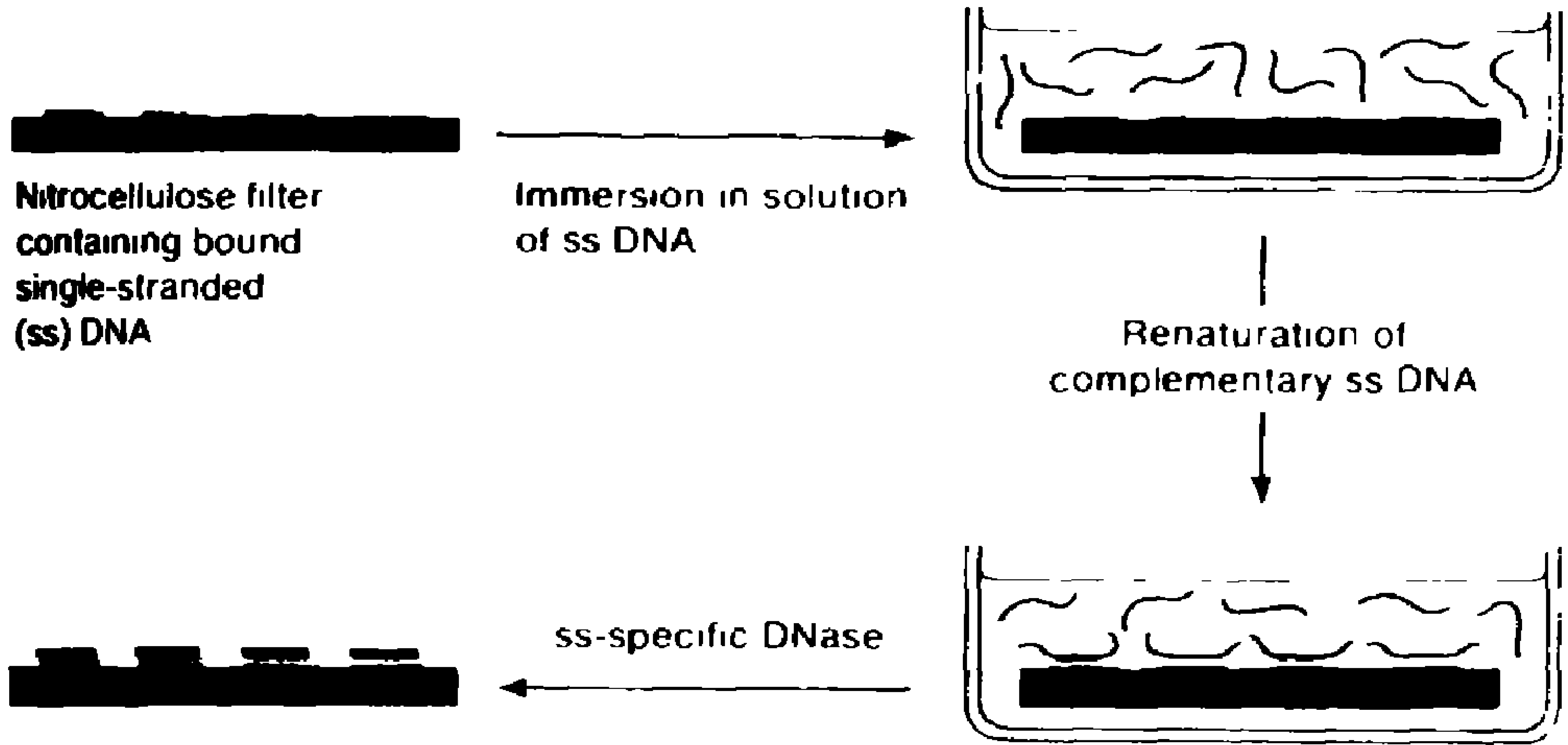
٢ – أن تكون درجة الحرارة مرتفعة بدرجة كافية لكى يحدث فك الروابط الإيدروجينية فى الحلزون والمذكورة سابقًا. ويجب أن تكون درجة الحرارة غير شديدة الإرتفاع لأن ذلك يمنع حدوث تكوين الروابط الإيدروجينية فى الحلزون الواحد السابق ذكرها. درجة الحرارة المثلى لإنعكاس الدنترة هى أقل من ٢٠–٢٥ درجة عن T_m.

تعتبر حالة إنعكاس الدنترة بطيئة جدًا بالنسبة للدنترة. حيث أن العامل المحدد لإنعكاس الدنترة ليس إلتفاف الحلزون (الذى يحدث بسرعة فى ثوان) ولكن هو الإصطدام الدقيق بين جزيئات دنا المنفردة المكملة لبعضها بحيث أن تزاوج أى إرتباط القواعد يحدث فى المكان الصحيح حيث أن الإصطدام الدقيق عشوائى نتيجة لحركة عشوائية فإنه معتمد على التركيز concentration dependent process. فى حالة التركيزات المتبعة فى المعامل والمناسبة لهذه الحالة فإن إنعكاس الدنترة يأخذ عدة ساعات. حدوث إنعكاس الدنترة يمكن ملاحظته وتقديره بواسطة الإنخفاض فى إمتصاص دنا فى المحلول للأشعة الفوق بنفسجية.

التهجين بواسطة الفلتر

Filter Hybridization

توجد أنواع من المرشحات filters غشائية (membrane filters) مصنوعة من النيتروسيليوز nitrocellulose. تتميز هذه المرشحات بأنها ذات قدرة كبيرة على ربط أو إلتصاق خيط دنا المفرد أى حلزون دنا المفرد ولكنها على العكس من ذلك غير قادرة على ربط أو إلتصاق دنا العاد المزدوج الحلزون أو حتى رنا بها. وهذه تعتبر طريقة هامة فعالة فى قياس درجة التهجين بين جزيئات دنا (شكل ١٩).



شكل (١٩): تهجين دنا على مرشحات غشائية من النيتروسيلليوز تحتوى دنا وحيد الشريط ثم الغمر فى محلول دنا وحيد الشريط ثم عكس الدنترة وفى الخطوة الأخيرة المعاملة بانزيم Dnase والذى يحلل دنا وحيد الشريط فقط ولا يحلل دنا ثنائى الحلزون.

وفى هذه الطريقة يتم ترشيح محلول دنا مدنتر. تـرتبط الخيـوط (الحلزونـات) السائبة المنفردة بشدة بالمرشح بواسطة العمـود الفقـرى للجزيـئ وهـو السـكر والفوسفات sugar- phosphate backbone ولكن تبقى القواعد حرة سائبة. بعد هذه المعاملة يوضع المرشح فى أنبوبة زجاجية صغيرة vial بها محلول كشاف أو جوهر كشاف reagent والذى يمنع إلتصاق إضافى لخيوط دنا السائبة أى يمنـع إلتصـاق كمية زائدة من خيوط دنا السائبة بالمرشح كما يضاف للأنبوبة كمية صغيرة من دنـا مدنتر مشع. بعد فترة كافية لحـدوث حالة إنعكاس الدنترة يتم غسيل المرشـح. إذا

وجد على المرشح آثار للإشعاع دليل على حدوث حالة إنعكاس الدنترة والعكس صحيح.

تستخدم الطريقة السابقة للتعرف على درجة تماثل تتابع القواعد لكائنين مختلفين ومثال لذلك عند معاملة المرشح بدنا البكتيريا *Escherichia coli* ثم معاملته بدنا مدنتر مشع للبكتيريا *Salmonella typhimurium*. تعتبر كمية ودرجة تركيز الإشعاع على الفلتر – المرشح – كقياس حيث أنها تتناسب طرديًا مع درجة توافق أجزاء دنا للبكتيريا الثانية مع البكتيريا الأولى. يدل على ذلك أن تتابع القواعد فى دنا مفرد يماثله أى يكمله بدرجة عالية أو مناسبة من التكامل **sufficient complementarity** تتابع القواعد فى جزيئ دنا آخر مفرد، ولذلك فإن هذا الإختبار يعطى فكرة عن درجة التماثل فى تتابع القواعد فى كائنين مختلفين **degree of sequence similarity**. هذه التجارب تستخدم بشدة فى أبحاث التطور **evolution** ونظريات التطور **evolutionary theory**. كلما زاد التماثل فى تتابع القواعد كلما كان ذلك دليلاً على درجة القرابة بين الكائنات المختلفة. تستخدم هذه فى دراسة القرابة بين الكائنات الدقيقة وكما تستخدم أيضًا فى الكائنات الراقية ومنها النباتات الزهرية ومن أمثلة ذلك العائلة البقولية والعائلة النجيلية كما سبق ذكره.

يمكن إستخدام هذه الطريقة أيضًا فى التعرف على درجة تقارب أو توافق أو تماثل رنا لأجزاء من دنا. تسمى هذه الحالة التهجين بين دنا ورنا **DNA-RNA hybridization** وفى هذه الطريقة بعد إلتصاق الشرائط (الحلزونات المفردة) لدنا بالفلتر فإنه يوضع فى محلول يحتوى رنا مشع وبعد حدوث إنعكاس الدنترة فإنه يتم غسيل الفتلر – المرشح. يتم التعرف على درجة التهجين بين دنا ورنا بواسطة درجة تركيز الإشعاع على الفلتر بعد غسله وذلك بإستخدام عداد إشعاع مناسب مثل **liquid scintillation counter**.

يمكن إستخدام طريقة التهجين بواسطة الفلتر – المرشح – للترعف على درجة التماثل فى تتابع القواعد فى قطعتين أى جزئين من دنا **DNA segments**. يتم عمل

ذلك بواسطة تغيير قيم pH وتركيز الملح ودرجة حرارة إنعكاس الدنترة. فى بعض الظروف الصارمة stringent conditions وهى التى تسمح بحدوث annealing فى حالة عندما يكون التوافق أى التكامل بين القواعد تقريبًا تام ولكن فى حالة بعض الظروف الأقل صارمة less stringent conditions وهى التى تسمح بحدوث annealing عندما يكون التوافق بين القواعد غير تام أى جزئى.

إزدواج حلزوني دنا الغير متماثلين:

DNA Heteroduplexes

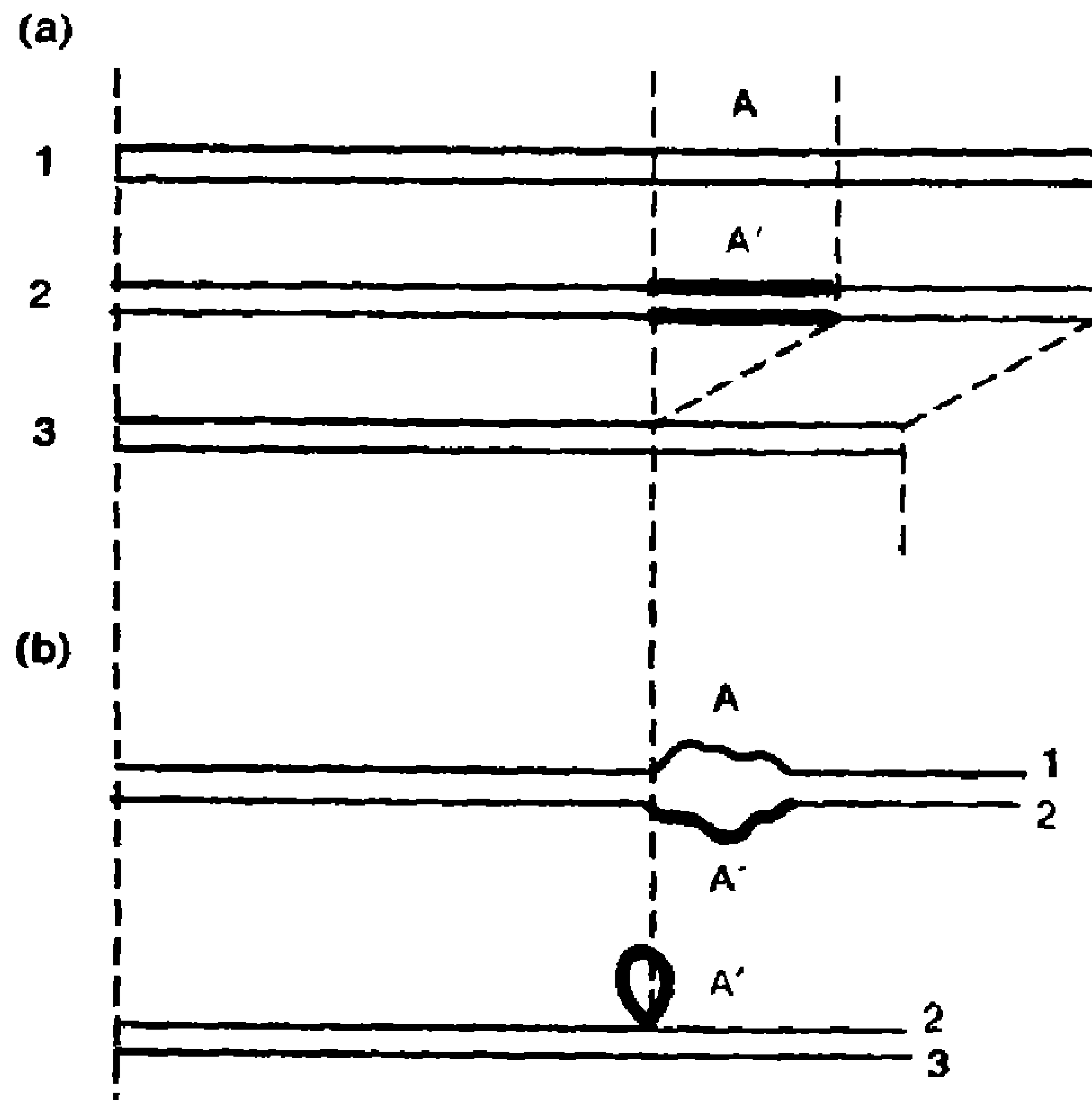
يمكن استخدام إنعكاس الدنترة مع المجهر الإلكترونى وذلك لتحديد مناطق بها إختلاف فى تتابع القواعد أو مناطق فيها نقص فى تتابع القواعد أى أنها أقصر وذلك بالنسبة للشريط (الحلزون المفرد) المفرد الواحد من دنا. هذه الطريقة تسمى heteroduplex mapping أى خرائط إزدواج حلزونى دنا المفردين. وفى حالة إستعمال ثلاثة أنواع من دنا أحدهما طويل والثانى بنفس الطول ولكنه يختلف عن السابق فى جزء معين حيث يختلف هذا الجزء فى ترتيب القواعد والثالث أقصر فى الطول. ثم يتم عمل دنترة لهذه الجزيئات من دنا وعند عمل عكس الدنترة للنوع الأول والثانى أى لخليط منها يمكن أن تتكون جزيئات عادية خليطة ولكن يحدث عند مكان الإختلاف أى الجزء الغير متوافق أى الغير مكمل لبعضه تباعد ويسمى هذا الجزء فقاعة bubble. وفى حالة عكس الدنترة بين النوع الثانى والنوع الثالث يتكون فى مكان الجزء الناقص عقدة loop (شكل ٢٠).

دنا الحلقي والزائد الحلزونية

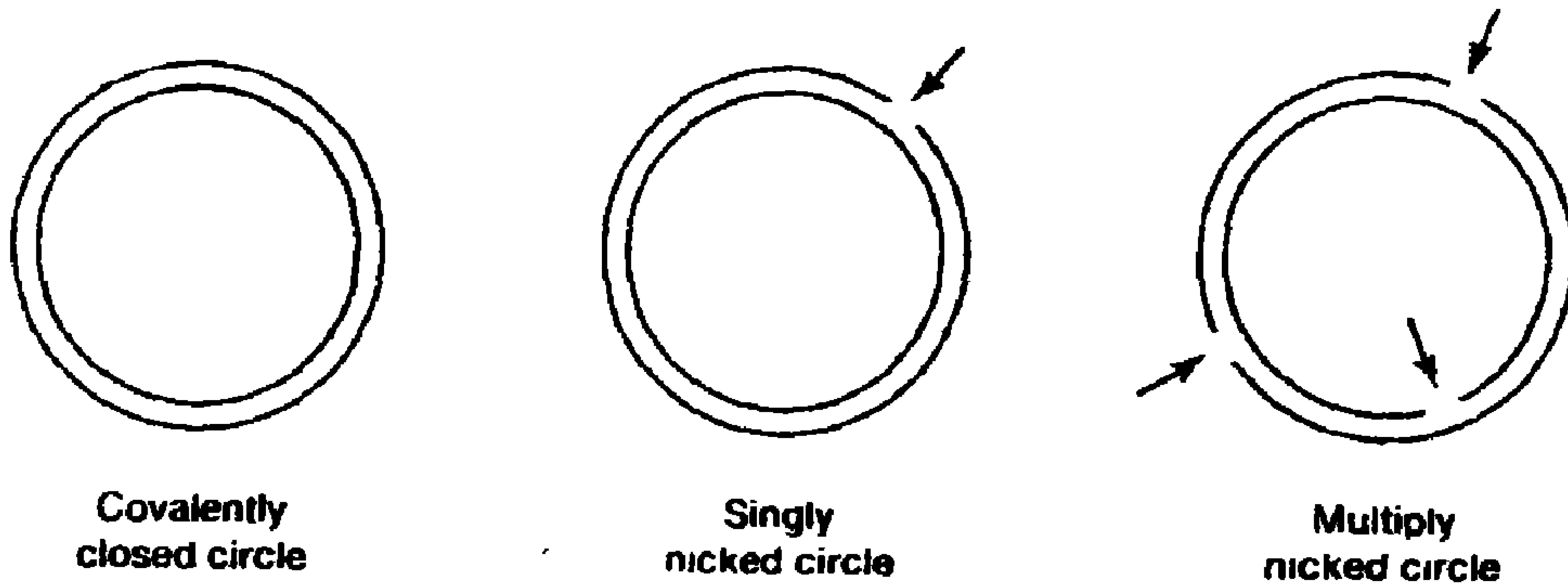
Circular and Superhelical DNA

يعتبر الكروموسوم فى غالبية الكائنات بدائية النواة حلقى الشكل وأيضًا يكون حلقى الشكل فى البلازميدات. يمكن أن يكون الكروموسوم الحلقى (والذى يتكون من حلزونين دنا) مغلق تمامًا ويسمى covalently closed circle أو يكون حلقة مفتوحة

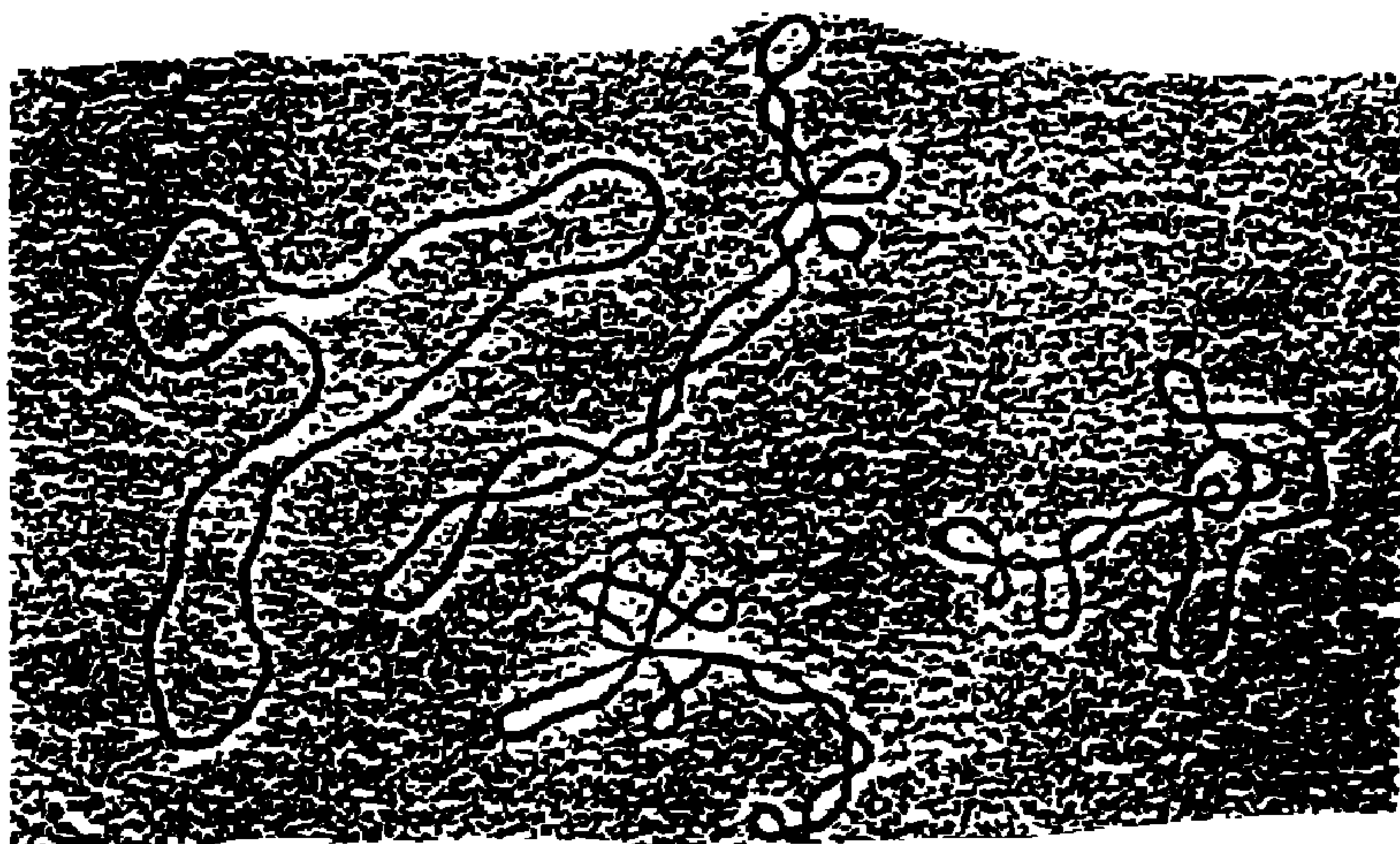
وذلك بقطع فى مكان واحد وتسمى سiingly nicked circle أو يكون حلقة مفتوحة بأكثر من قطع أى أثنين أو ثلاثة إلخ وتسمى multiply nicked circle (شكل ٢١).



شكل ٢٠: ٣ جزيئات دنا ١، ٢ مختلفين فى الجزء A، A´ ورقم ناقص A، A´. الخطوط المتقطعة تعتبر مرجع لذلك. الشكل b به DNA heteroduplexes بين جزيئ دنا ١، ٢ وبين ٢، ٣



شكل ٢١: covalently closed circle وهده الحلقة بها قطع واحد وثلاثة أيضا. عادة يكون الكروموسوم الحلقى المغلق به حلزنه متميزة supercoiling أى متميز الحلزنة أو زائد الحلزنة. بمتميز الحلزنة أو زائد الحلزنة ليس أن الحلزنة زائدة أو متضاعفة بل المقصود به أنه يوجد نوع أو طراز آخر من الحلزنة يحدث فى الجزيئ (شكل ٢٢).



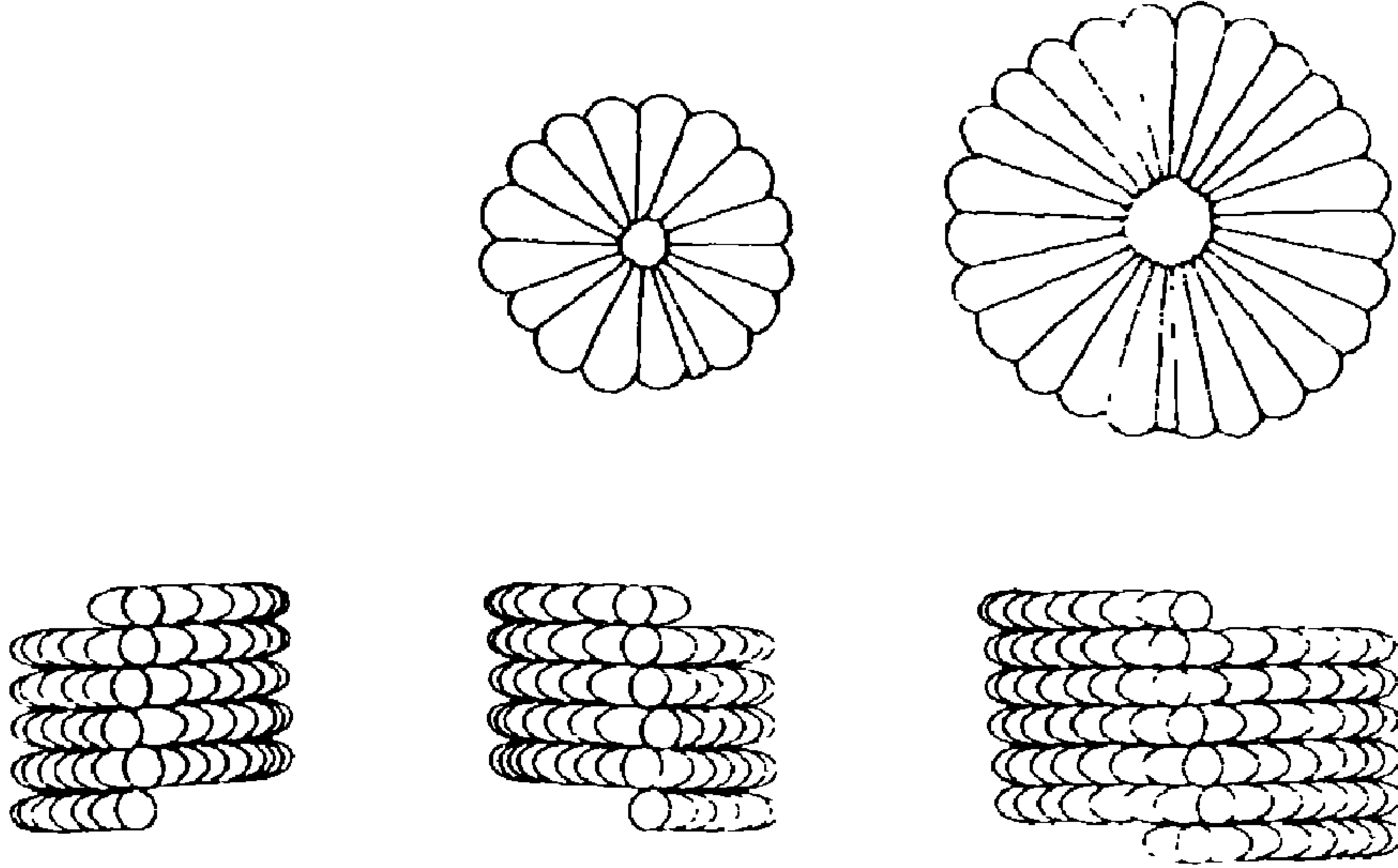
شكل ٢٢: جزيئات دنا متميزة (زائد) الحلزنة وجزيئ nicked circuler للفاج PM2.

من الأهمية بمكان شرح ما هو المقصود بالحلزون الموجب أى الحلزون اليمينى right- handed or positive coil والحلزون السالب أى الحلزون اليسارى left- handed or negative coil يعتبر الإلتفاف الحلزونى helical coiling إذا نظرت لمحور الحلزون من أسفل helical axis فإذا كان الإلتفاف فى أتجاه عقرب الساعة يسمى حلزون موجب أو يمينى وإذا كان الإلتفاف فى عكس إتجاه عقرب الساعة يسمى حلزون يسارى أو سالب. جزيئ دنا يعتبر حلزون يمينى (شكل ٢٢أ).

يمكن أن يلتحم طرفى حلزون دنا الشريطى بطريقة معينة لتتكون حلقة. وفى حالة إلتفاف أحد الطرفين للشريط الحلزونى ٣٦٠ درجة بالنسبة للطرف الآخر ليسبب فك جزنى للحلزون المزدوج ثم يلتحم الطرفين فإنه تتكون حلقة مغلقة من جزيىء دنا تسمى underwound covalent closed circle أى الحلقة المغلقة المحولة أو المفكوكة جزيئا، وإذا أعيد تكوين الروابط الإيدروجينية، فإنها تلتف twisting بطريقة عكسية فى عكس إتجاه الفك لتكون حلقة ملتفة معقودة لتخفيف الضغط على الحلقة وفى هذه الحالة تصبح الحلقة ذات عقدة واحدة معقودة لتخفيف الضغط على الحلقة وفى هذه الحالة تصبح الحلقة ذات عقدة واحدة node وتسمى أيضًا عبور واحد فقط

one crossing over وتأخذ الحلقة شكل ثمانية باللغة الإنجليزية 8. تسمى فى هذه الحالة الحلقة المغلقة ذات العقدة الواحدة أو الحلقة المغلقة ذات العبور الواحد. وفى حالة حدوث فك قبل الإلتحام بمقدار ٧٢٠ درجة فإن ناتج تكوين الحلقة ضغط ثم فك للضغط أو تخفيف للضغط وذلك بالإلتفاف فى عكس إتجاه الفك وذلك بتكوين عقدتين أى عبورين وتسمى الحلقة المغلقة ذات العقدتين أو الحلقة المغلقة ذات العبورين. وهكذا يمكن أن تتكون حلقة مغلقة ذات ثلاثة عقد أو أربعة عقد (شكل ٢٣) أو خمسة عقد وهكذا. أما عن سبب حدوث الإلتفاف فى الإتجاه المعاكس twisting هو أنه فى حالة فك الحلزون ٧٢٠ درجة فإنه يحدث كسر لعشرون زوج من القواعد حيث حدث فك للحلزون فى دورتين (لفتين للحلزون) حيث أنه فى حالة دنا الشريطى يوجد ١٠ أزواج من القواعد لكل دورة أى لكل لفه. لكى تستمر حالة الحلزون اليمينى أى الموجب مع وجود عشرة قواعد لكل لفه فإنه يحدث تغيير فى دنا بطريقة معينة بحيث أن الفك يتم تعويضه بإلتفاف حلزونى سالب أى يسارى Underwinding is rewound and compensated for by negative twisting (Left handed) of the circle.

عادة دنا الحلقى الموجود فى الطبيعى أى دنا الحلقى يكون مبدئيًا مفكوك نسبيًا underwound ولذلك فإنه يحدث له حلزنه زائده سالبة negative superhelics. درجة الإلتفاف twisting تكون تقريبًا واحدة لجميع جزيئات دنا الحلقية حيث أن إلتفاف واحد سالب negative twist ينتج لكل ٢٠٠ زوج من القواعد أى ٠,٠٥ إلتفاف twists لكل لفه من الحلزون. وفى حالة البكتيريا فإنه الفك الجزئى قبل حدوث الحلزنه المتميزة فى جزيىء دنا لا يحدث نتيجة للفك الجزئى قبل إلتحام الجزيىء ولكنه يتم عمله على الجزيىء المتكون فعلاً بواسطة إنيم دنا جيريز DNA gyrase.



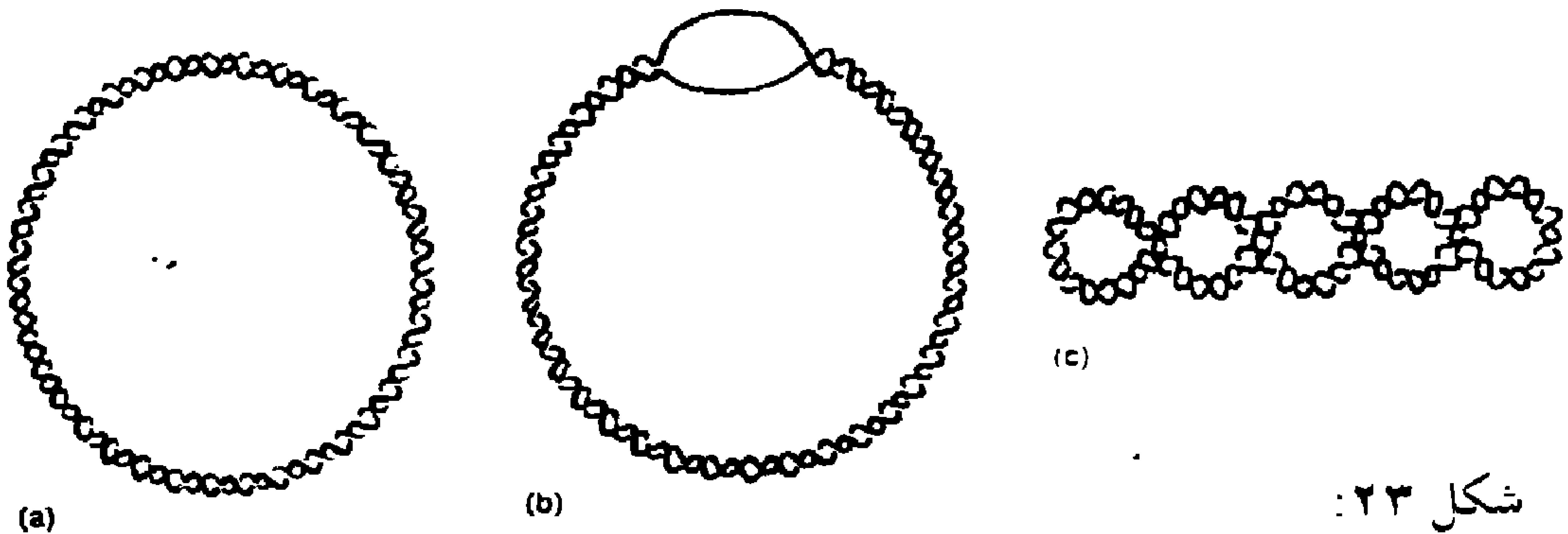
شكل ٢٢: رسم يوضح شكل سطحى (علوى) وأشكال جانبية (سفلى) لتوضيح إتجاه حلزون دنا مع إختصار كبير فى طول الجزيء.

(a) فيروس تبرقش (موزايك) الدخان (التبغ) Tobacco mosaic virus (TMV).

(b) فيرس خشخشة الدخان (التبغ) Tobacco rattle virus (TRV).

كلا الحالتين السابقتين left handed helices

(c) يوضح TMV لو أنه فى شكل عكسى أى right handed helics



شكل ٢٣:

a – Non-supercoiled covalent circle 36 turns of the helix (٣٦ لفه)

b – An underwound covalent circle having only 32 turns of the helix (bubble)

c – The molecule in part (b) but with four superhelical turns to eliminate under winding.

Note- In solution b and c would be in eqilibrium. It would shift toward b with uncreasing temperature.

الجزيء فى شكل c وله أربعة حلزنة متميزة لإزالة underwinding.

ملحوظة: فى المحلول يكون b، c فى إتزان وبزيادة درجة الحرارة يحدث إنتقال للحالة b.

الأجزاء وحيدة الخيط فى الحلزنة الزائدة:

Single-Stranded Regions In Superhelices:

أتضح مما سبق أى نتيجة لوجود جزء مفكوك نسبيًا فى جزيىء دنا الحلقى فإنـه يحدث ضغط على الجزيىء ولتخفيف هذا الضغط نتيجـة لوجـود الفـك الجزيـىء underwinding فإنه تحدث حلزنة متميزة سالبة. ولكـن يمكـن أن تحـدث ثلاثـة إحتمالات أخرى لتخفيف الضغط نتيجة للفك الجزئى وهى:

١ - إحتمال تغيير عدد أزواج القواعد فى كل لفة كاملة للحلزون. ولكن هذا نظريًا ولا يحدث إطلاقًا تبعًا لقوانين الديناميكا الحرارية.

٢ - يمكن أن يحدث الفك على هيئة فقاعة واحدة أو أكثر وتكون الفقاعة وحيـدة الخيط (شكل ٢٣).

٣ - يمكن أن يكون تلافى الفك الجزئى جزئيًا بواسطة الحلزنة المتميزة وجزئيًـا بواسطة الفقاقيع.

يتضح من ذلك أن جزيىء دنا عبارة عن تركيب دينـاميكى dynamic structure ويحدث له بإستمرار فك جزئى إنتقالى أى مرحلـى transient unwinding. عامـة الضغط الناتج على الجزئى نتيجة للفك الجزيىء يمكن تداركه بواسطة عـدد وحجـم الفقاقيع ومدتها وأيضًا بواسطة الحلزنة المتميزة. وفى حالة وجود جزيىء دنا حلقى مغلق غير مفكوك جزئيًا يمكن أ تحدث عملية التنفس breathing وهى عملية يحدث فيها كسـر مرحلـى أى إنتقـالى transient breakage وإعـادة تكـوين الـروابط الإيدروجينية. درجة حدوث الحلزنة المتميزة تختلف عند حدوث عملية التنفس.

كيفية إثبات وجود الحلقات المغلقة معمليًا:

Experimental Detection of covalently Closed Circles:

يمكن أن يتكون دنا على هيئة حلقة مغلقة فى دورة حياة بعض الكائنـات. يوجـد أربعة طرق للتعرف على وجود هذه الأشكال أى التراكيب كما يأتى:

١ – الترسيب فى وسط قلوي مناسب للدنترة:

Sedimentation at denaturing alkaline pH

فى درجة pH أعلى من ١١,٣ وفى محلول من ملح الطعام تركيزه ٠,٣ جزيئى تحدث دنتره لدنا العادى الخيطى وليست الحلقى ويتكون خيطين أى شريطين (حلزونين) منفصلين يرسبان أسرع من جزيىء دنا العادى بدرجة ٣٠%. ولكن فى حالة الحلقة المغلقة فإن الحلزونين لا ينفصلان حيث أنه لا توجد لهما أطراف حرة أى منفصلة، ولذلك فإن الجزيىء يندمج مع بعضه collapase in a tight tangle ويرسب بسرعة أكبر من سرعة رسوب دنا العادى ثلاثة مرات. فى حالة وجود حلقة مغلقة ذات قطع واحد single nick فإنه يتكون جزيىء حلقى مفرد وجزيىء شريطى أى خيطى مفرد وترسب الحلقة أسرع من الشريطى الخيطى بدرجة ١٤% (شكل ٢٤ b).

٢ – الطرد المركزى المتزن فى محلول يحتوى على بروميد الإيثديم:

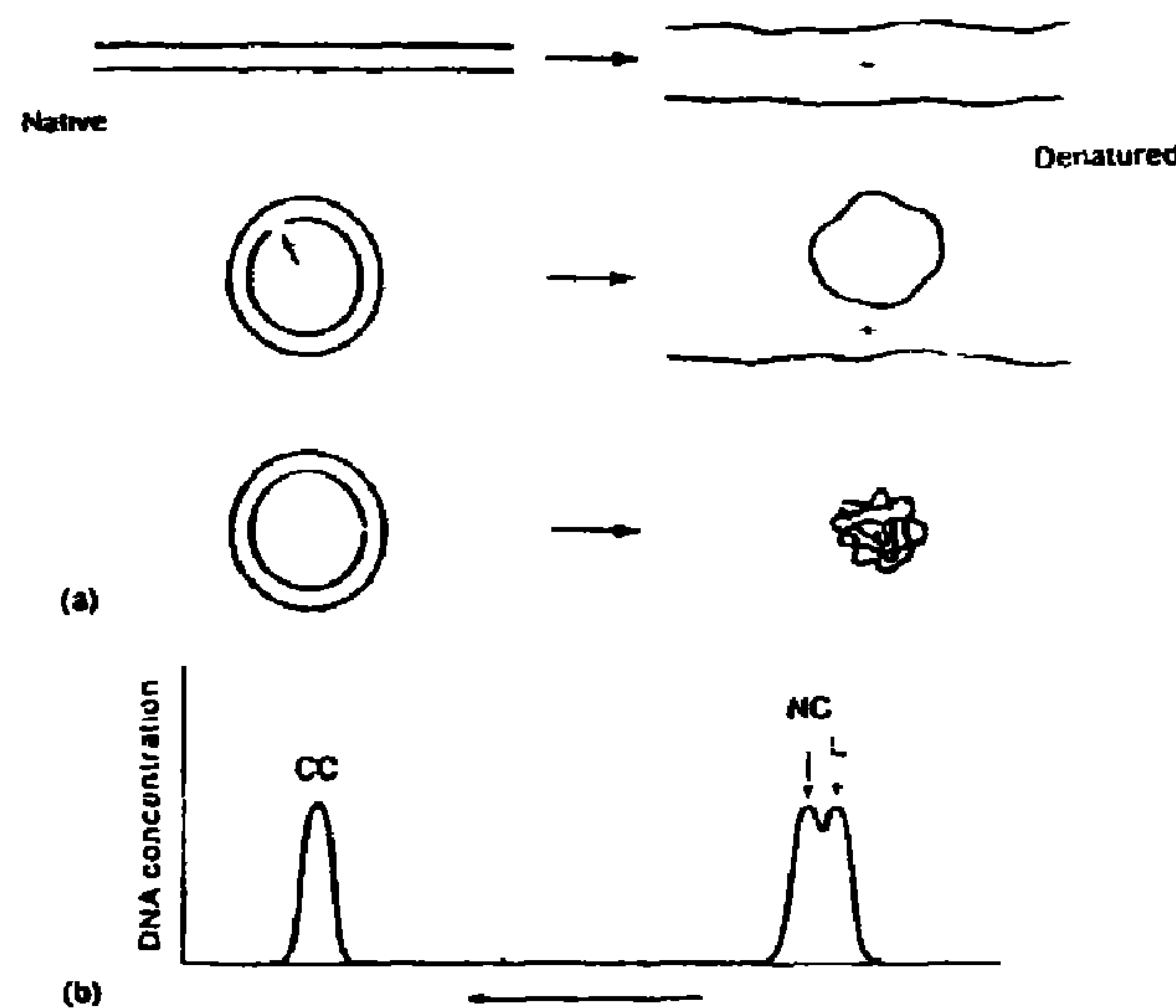
Equilibruim Centrifugation in CsCl-containing Ethedium-Bromide

يمكن لصبغة بروميد الإثيديم (شكل ٢٥) أن تلتصق وترتبط بشده بجزيىء دنا وبذلك تقلل من كثافته بدرجة ٠,١٥ جم/سم٣. أما عن طريقة الإرتباط فهو دخول جزيىء بروميد الإثيديم بين حلزونى دنا أن يتخلل intercalating بين أزواج القواعد فى حلزونى دنا وبذلك تسبب فك حلزونى دنا وتزداد حالة الفك كلما زادت كمية جزيئات بروميد الإثيديم المرتبطة. وفى الحلقات المغلقة وحيث لا توجد أطراف حرة للحلقة فعند الفك يلتوى أى يلتف twist الجزيىء كله فى الإتجاه العكسى، تزداد درجة الإلتفاف بزيادة عدد جزيئات بروميد الإثيديم المتداخلة فى الجزيىء. وفى النهاية لا يمكن لجزيىء دنا الحلقى المغلق أن يلتف أكثر من ذلك أى يصل للنهاية العظمى للإلتفاف ولذلك فإنه لا يمكن لجزيئات أخرى من بروميد أن تخلل الجزيىء. والعكس صحيح فى حالة الحقة ذات القطع أو الكسر الواحد أو أكثر وأيضًا فى حالة دنا الشريطى غير الحلقى العادى حيث أنه لا توجد ضغوط على الإلتفاف العكسى للجزيىء ولهذا يستمر الجزيىء فى أخذ جزيئات الصبغة بإستمرار. كلما زادت كمية

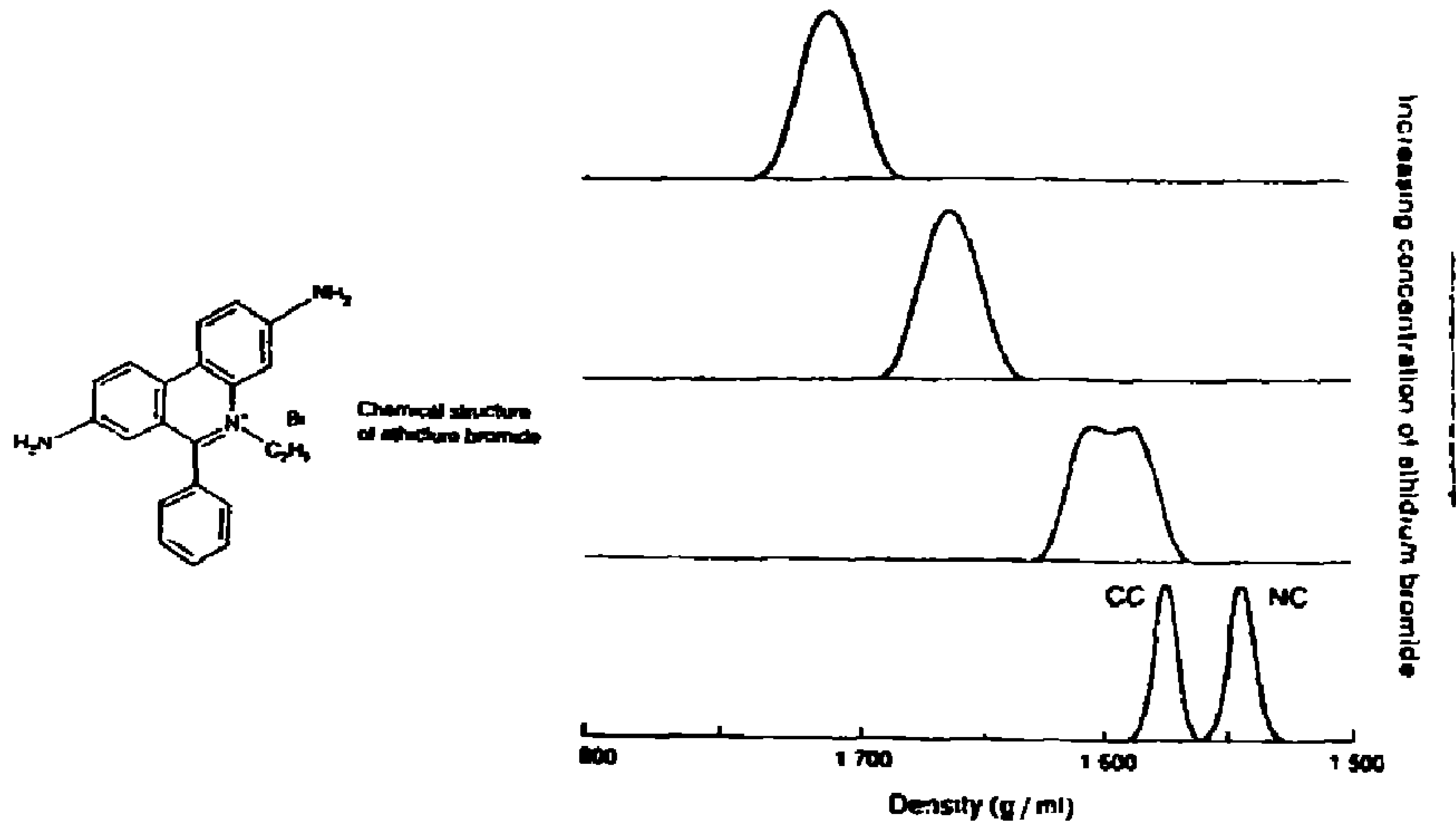
الصبغة المرتبطة بدنا كلما قلت كثافة جزيىء دنا وحيث أنه تبعًا للشرح السابق فإن كمية الصبغة المرتبطة بجزيىء دنا فى جالة دنا العادى الشريطى الغير حلقى أو دنا الحلقى ذو القطع الواحد أو الأكثر من قطع أو كسر تكون أكبر بكثير من كمية الصبغة المرتبطة بالحقلة المغلقة ولذلك فإن الحلقة المغلقة لها كثافة أكبر منه فى الحالات الأخرى وذلك عند إستخدام تركيزات مشبعة من جزيئات بروميد الإذيديم. نتيجة ذلك يمكن فصل الحلقات المغلقة عن الأنواع الأخرى بإستعمال الطرد المركزى المتزن equilibrium (شكل ٢٥). سيتم حالة شرح الطرد المركزى المتزن فى جزء لاحق.

٣ – يمكن التعرف على الحلزنة المتميزة أى الحلزنة الزائدة بواسطة المجهر الإلكترونى (شكل ٢٢).

٤ – يمكن التعرف على الحلزنة المتميزة بواسطة agarose gel electrophoresis وسيتم شرحها فى جزء لاحق فى هذا الباب.



شكل ٢٤: نواتج دنترة أشكال مختلفة من دنا (a)
(b) فصل Covalently closed circles
(CC) nicked circles (NC)، وجزيئات
شريطية linear (L) بواسطة الترسيب بقلوى السهم يمثل طول أنبوبة الطرف المركزى.
الترسيب من اليمين إلى الشمال.



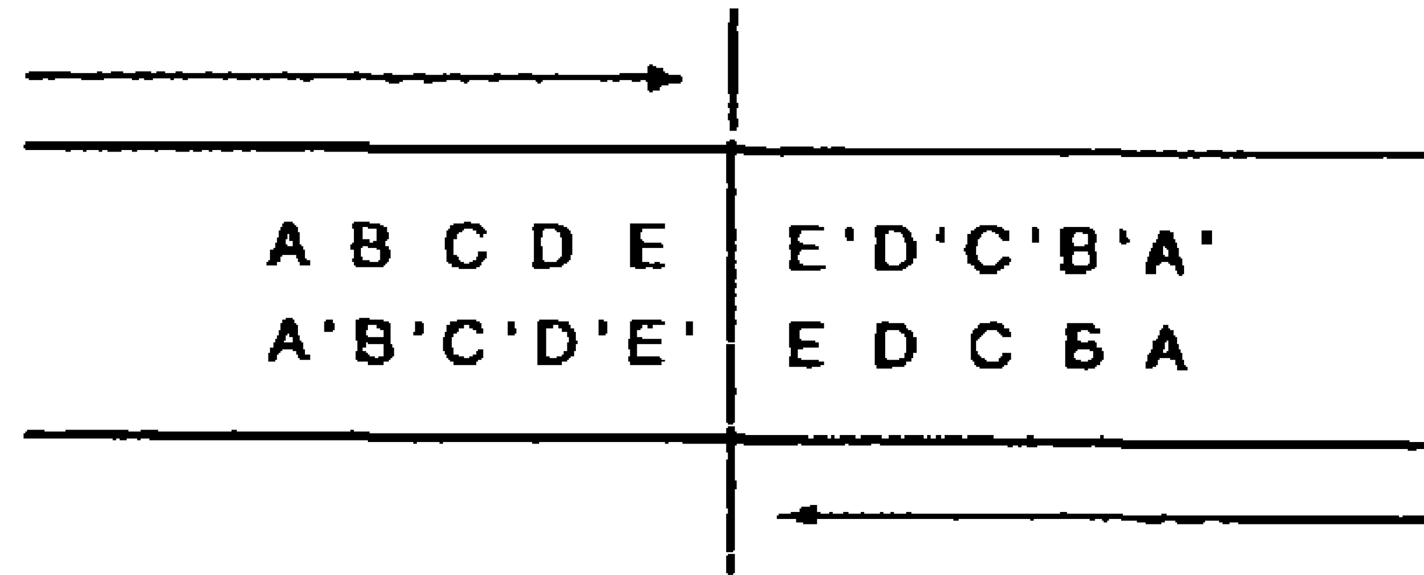
شكل ٢٥: التركيب الكيماوى لبروميد الإثيديم وتأثيره على كثافة دنا فى محلول مـــن كلوريد السيزيوم. مخلوط لكميات متساوية مـــن Covalently closed circle (CC)، و nicked circle (NC). تم عمل طرد مركزى فى محلول كلوريد السيزيوم محتـــوى علـــى تركيزات مختلفة من بروميد الإثيديم تقل كثافة دنا تدريجيًا. ترتبط CC بكمية أقـــل مـــن بروميد الإثيديم ولذلك فإنها ترسب عند كثافة أكبر.

التركيبات ذات تتابع القواعد الخاصة :

Structural Consequences of Special Base Sequences:

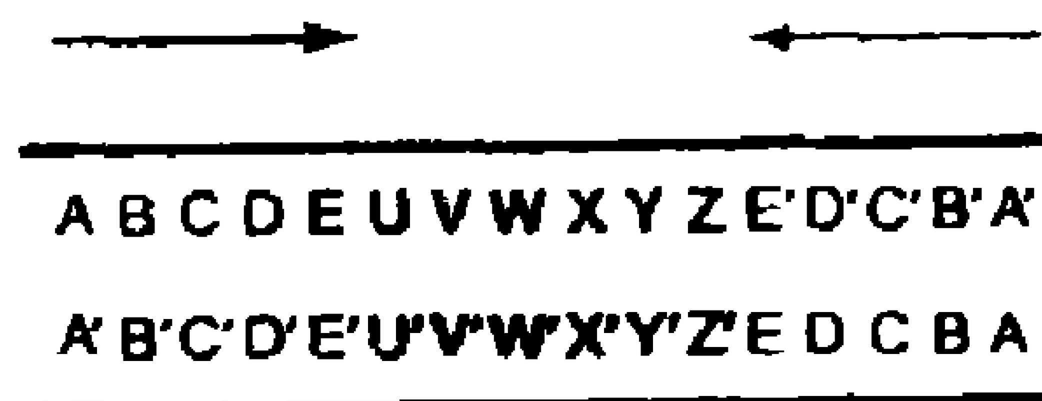
يوجد بعض حالات من تتابع القواعد تعتبر صفة فريدة للأحماض النووية. حيـــث يوجد تتابع للقواعد مكرر فى بعض المناطق وبذلك يكون للأحماض النووية وحيـــدة الخيط وثنائية الخيط صفات خاصة وشكل خاص. وفى بعض أنواع تتـــابع القواعـــد وحيث تتبادل البيورينات والبيريميدينات ينتج عن ذلك منطقة حلزنـــة يســـارية left-handed helical region فى جزيىء دنا.

أحد التركيبات الخاصة من حيث تتابع القواعد هو التركيب ذو القـــراءة العكســـية palindrome. التركيب ذو القراءة العكسية هو عبارة عن تتابع للقواعد له شكل عام كما يأتى (شكل ٢٦).



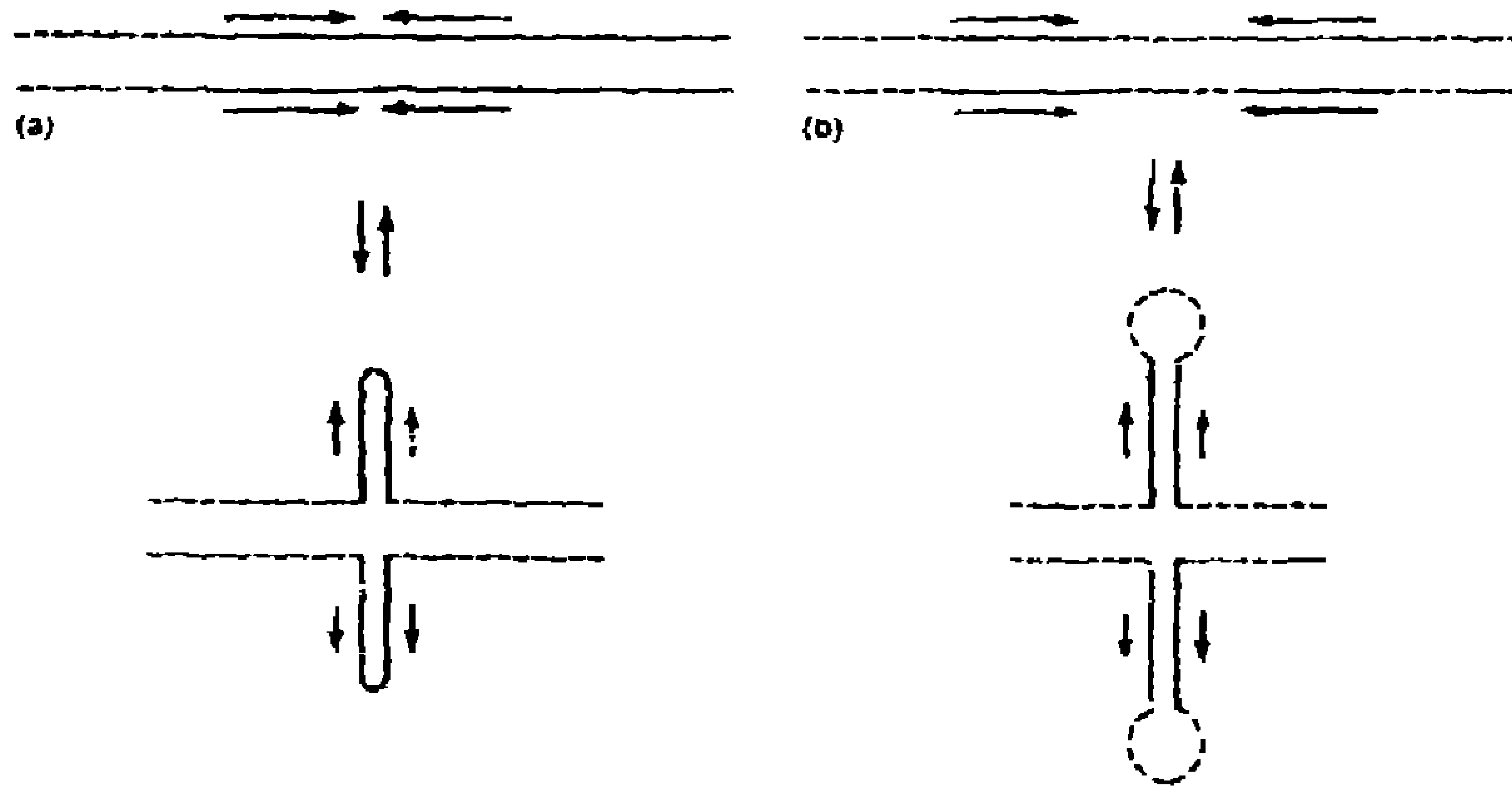
شكل ٢٦: **Palindrome**.

فى الحالة السابقة نجد أن A، و A′ وأيضًا B، B¹ وأيضًا C، و C¹ وأيضًا D، D¹ وأيضًا E و E¹ عبارة عن قواعد مكملة لبعضها ويمكن أن تتزاوج مع بعضها **able to pair** ويعتبر الخط العمودى عبارة عن محور للتماثل **an axis of symmetry** ويمكن للجزء الثنائى الحلزونى على يمين المحور أن يلتف عند المحور بزاوية مقدارها ١٨٠ درجة على مستوى الصفحة. ولذلك توجد مصطلحات خاصة أخرى يمكن أن تستعمل فى حالة التراكيب ذات القراءة العكسية وهى الإنقلاب المكرر **inverted repeat** أو منطقة التماثل الثنائى **dyad symmetry**. يتراوح طول التركيب ذو القراءة العكسية من عدد قليل من القواعد إلى حوالى خمسون قاعدة. يمكن أن يفصل القواعد الخاصة بالإنقلاب جزء عادى لا ينقلب ويسمى بالفاصل **spacer** (شكل ٢٧).



شكل ٢٧. الفاصل **Spacer**.

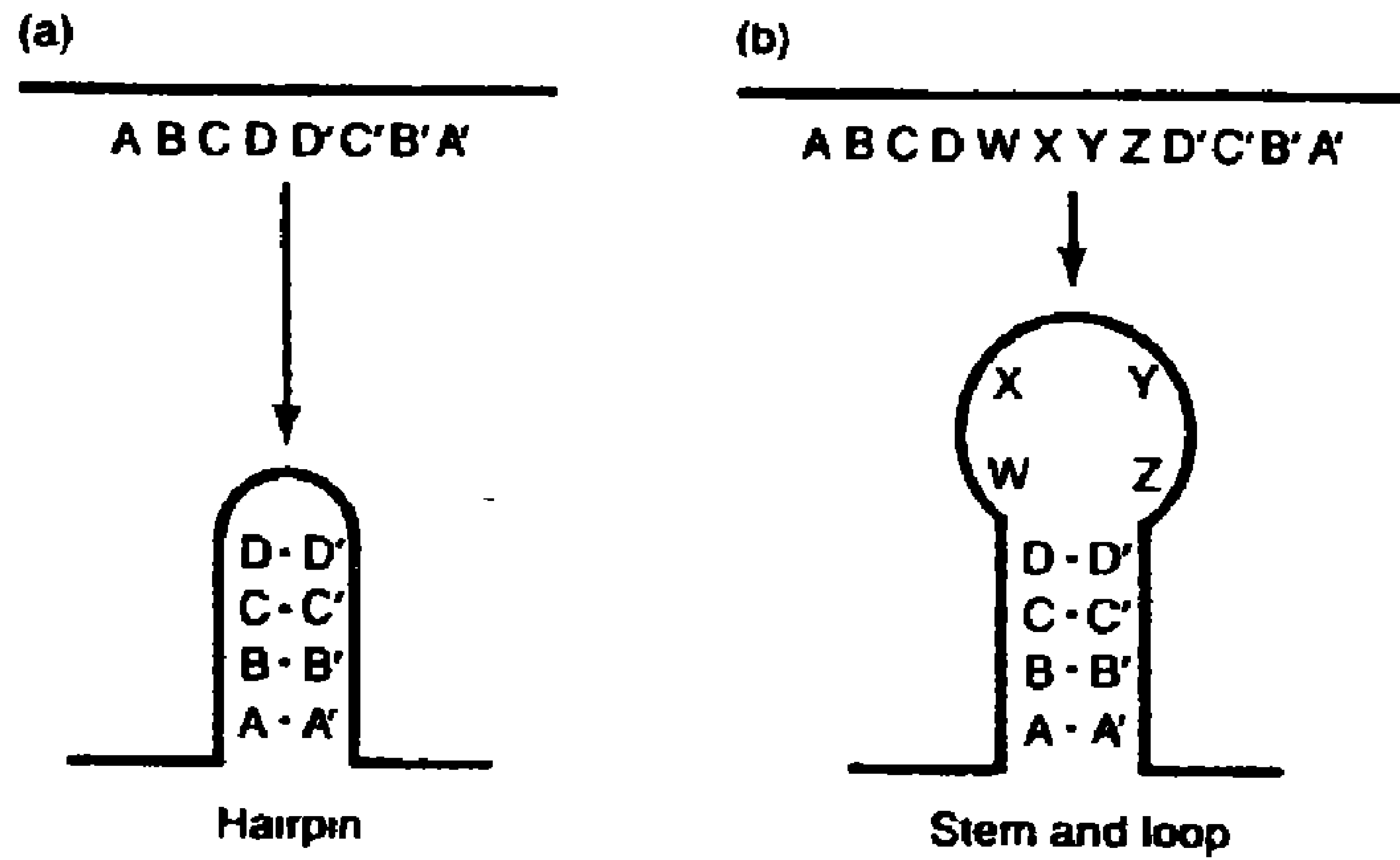
فى هذه الحالة يسمى بالإنقلاب المكرر inverted repeat. وحيث أن من المعروف أنه يمكن حدوث عملية التنفيس breathing فى دنا فإنه يمكن أن يحدث تغيير فى شكل جزيىء دنا (شكل ٢٨) نتيجة الإنقلاب المكرر والتنفيس.



شكل ٢٨: تكوين الشكل الصليبي في دنا بتكوين 2 inverted repeats متصـلين (a) أو بفصلهما الفاصل (b). الأسهم الأفقية تشير إلى إتجاه تتابع القواعد orientation of the sequences.

عند إنفصال الحلزونين المكملين لبعضهما فإنـه يحـدث إرتبـاط بـين القواعـد المتوافقة أى المتكاملة فى الشريط الواحد أى الخيط الواحد أى الحلزون الواحد وينتج عن ذلك تكوين فرع جديد ثنائى الحلزون ds. يسمى الشكل الناتج بالشكل الصـليبى cruciform (شكل ٢٨) تعتبر الأشكال الصليبية غير ثابتـة نسـبيًا عنـد مقارنتهـا بالحلزونين العاديين الموجودين فى جزيىء دنا العادى لأنها تحتوى على عدد أقل من الروابط الإيدروجينية. يمكن إنتاج هذه الأشكال الصليبية فى المعمل ولكنها لا تكـون ثابتة فى حالة دنا الموجود فى الأنسجة الحية. وتعتبر التراكيب ذات القراءة العكسية palindromes والتراكيب ذات الإنقلاب المكرر لهما تأثير جوهرى على تركيب رنـا وأيضًا دنا ss أى وحيد الحلزون الموجودة فى بعض الفاجات. ومن المعروف أيضـًا أن يمكن لدنا وحيد الحلزون ولرنا تكوين روابط إيدروجينية فى الشريط الواحـد أى الخيط الواحد أى الحلزون الواحد وذلك فى حالة وجود قواعد متوافقة قريبـة مـن بعضها. فى هذه الحالة ينتج عن التركيب ذو القراءة العكسية جزء أى قطعة تكـون ثنائية الحلزون فى الحلزون الواحد وتسمى الدبوس الشـعره hairpin (شـكل ٢٩)

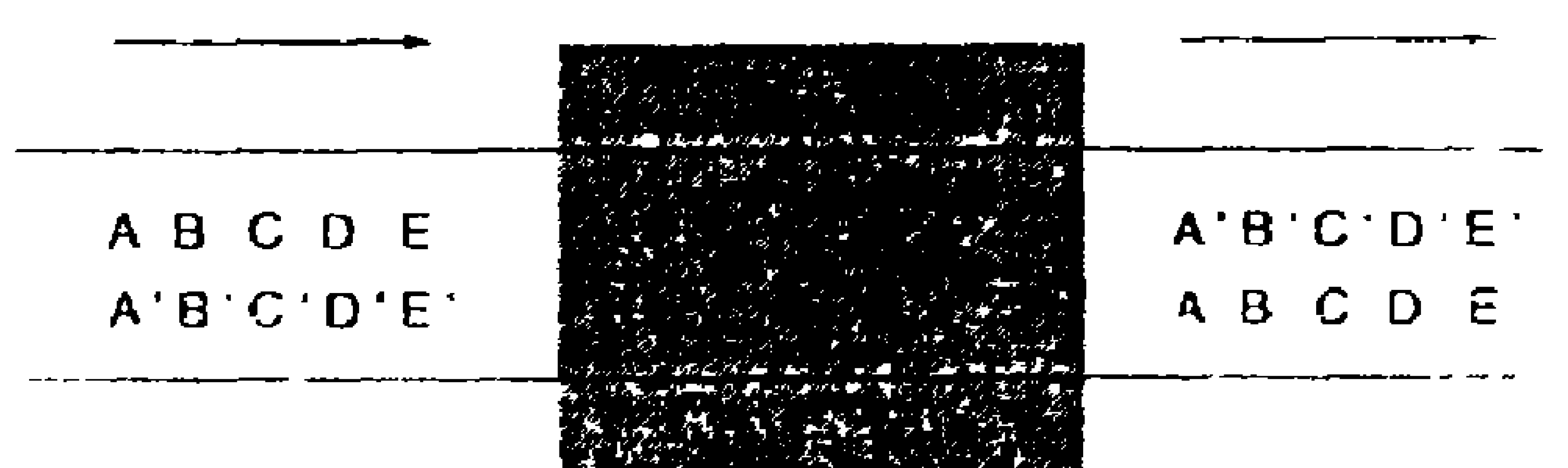
وفى حالة الإنقلاب المكرر المتخلل interrupted inverted repeat ينـــتج جـــزء أى فرع ثنائى الخيط حيث أنه فى هذا الجزء يحدث إرتباط بين القواعـــد المتوافقـــة أى المكملة لبعضها بروابط إيدروجينية ولكن يوجدد فى قمة الفرع حلقة وحيدة الخيط أى وحيدة الشريط أى وحيدة الحلزون terminal single-stranded loop وتسمى بإســـم الساق والحلقة أو الساق والعقدة stem-and-loop (شكل ٢٩ب). هذه التراكيب الثانوية من خصائص خيط رنا المفرد.



شكل ٢٩ : أشكال hairpin (a)، stem and loop (b) والتى تتكون من نوعين مـــن palindromes فى شريط مفرد واحد من دنا ss DNA.

الساق والحلقة أى الساق والعقدة له دور هام فى تنظيم تخليق رنا.

يمكن أن يحدث تتابع للقواعد معين ويحدث له تكرار أى يتكـــرر تتـــابع القواعـــد المعين فى نفس الإتجاه in the same orientation ويكون هذا التتابع مكـــرر بـــدون فاصل أو مع وجود قواعد فاصلة تسمى spacer كما سبق ذكره (شكل ٣٠) وتســـمى هذه الحالة من تتابع القواعد فى نفس الإتجاه بإسم التكرار المباشـــر direct repeats وهذه الحالة لا ينتج عنها تكوين الأشكال السابق ذكره وهى دبوس الشعره أو الساق والحلقة أو غيرها فى حالة دنا ثنائى الحلزون وفى حالة رنـــا وحالـــة دنـــا وحيـــد الحلزون.



شكل ٣٠: تتابع القواعد فى نفس الإتجاه فى وجود فاصل.

أنواع وتراكيب وأشكال الأحماض النووية:

تحتوى الخلايا العادية على تركيز من رنا أعلى من تركيز دنا عشرة أضعاف، وذلك باستثناء قليل من الفيروسات التى تصيب الكائنات ذات النواة الحقيقية وأيضا بعض الفاجات رنا RNA phages. وفى حالة الفيروسات قد يوجد رنا على هيئة خيط مفرد ويسمى رنا وحيد الخيط (single stranded RNA (ssRNA كما فى فيروس تبرقش التبغ TMV أو يكون ثنائى الخيط double stranded RNA (ds RNA) كما فى فيروس تقزم الأرز RDV أو يكون دنا ثنائى الخيط double stranded DNA (ds DNA، كما فى فيرس تبرقش القنبيط CaMV أو يكون دنا أحادى الخيط (ssDNA) كما فى فيرس التبرقش الذهبى فى الفاصوليا bean golden mosaic virus.

لكن فى المعتاد فى الكائنات الحية يوجد رنا على هيئة خيط مفرد عديد النيوكليوتيدات single-standed polynucleotide. ففى الكائنات الحية يوجد ثلاثة أنواع من رنا وهى رنا الريبوسومى ribosomal RNA ورنا الناقل (tRNA) transfer RNA ورنا الرسول mRNA.

ففى حالة البكتيريا مثلاً يوجد ثلاثة أنواع من رنا الريبوسومى وحوالى خمسون نوع مختلفة من رنا الناقل وأنواع كثيرة من رنا الرسول تماثل فى عددها تقريبا عدد الجينات وجميع هذه الجزيئات من رنا تشابه فى مظهرها دنا وحيد الحلزون من حيث أنها مناطق وحيدة الحلزون يتخللها مناطق ثنائية الحلزون. عامة يتراوح بين إلى ١/٢ إلى ٢/٣ من القواعد تكون مزدوجة أى متزاوجة أى مرتبطة paired. فى حالة دنا وحيد الحلزون يكون الإزدواج أى التزاوج بين القواعد المتوافقة والمكملة لبعضها يكون فى مناطق كثيرة قصيرة كل منطقة تتكون من ستة أو أقل من أزواج

القواعد. وحيث أن إزدواج القواعد فى الحلزون المفرد لدنا يكون فى مناطق قصيرة جدًا لعدد قليل من القواعد والذى يحدث بالصدفة فى أى مكان من حلزون دنا. ولذلك إذا تم عمل عملية دنترة لجزيىء ثم بعد ذلك ترك لحـدوث عمليـة إزدواج القواعـد وتكوين روابط إيدروجينية فإن نظام حدوث إزدواج للقواعد وشكله يختلف من جزيئ إلى آخر. والعكس صحيح تمامًا فى جزيىء رنا وحيد الشريط فإن المناطق المزدوجة من الشريط تتكون من أعداد كبيرة من القواعد قد يصـل إلـى خمسـون زوج مـن القواعد المتزاوجى أى المكملة لبعضها أى المرتبطة مع بعضها، وأيضًا لكل جزيـىء رنا معين نظام معين ثابت للإزدواج خاص بكل جزيىء معين.

إنزيمات النيوكلينيز:

Nucleases:

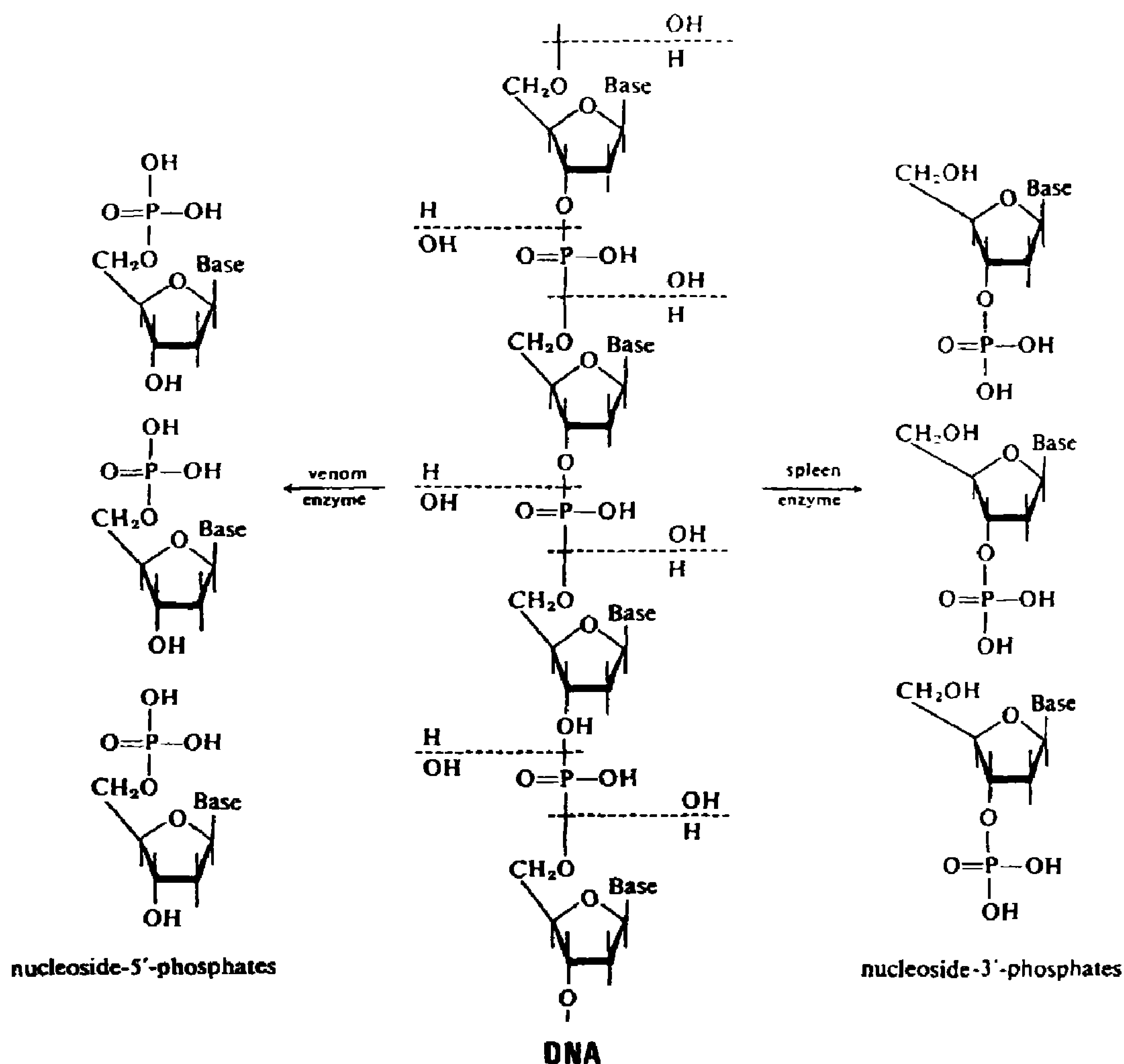
يمكن هدم وتحليل DNA، RNA إلى نيوكليوتيدات منفردة حرة أو جزيئـات ذات عدد قليل من النيوكليوتيدات كيماويًا أو إنزيميًا. وعلى سبيل المثال أنه عند pH رقم ١ فإن الروابط الفوسفورية ثنائية الأستر والروابط الجليكوسيدية N-glyosidic bond بين القواعد والسكر تنكسر وينتج قواعد حرة.

تسبب إنزيمات النيوكلينيز فصل أو تحليل أو تكسر أو هدم الأحمـاض النوويـة. غالبية هذه الإنزيمات لها تخصص كيمياوى واضح حيث أن بعض منها متخصص فى هدم DNA ويسمى دى أوكسى ريبونيوكلينيز (Dnase) والبعض الآخر متخصص فى هدم RNA ويسمى ريبونيوكلينيز ribonuclease (RNase). ويزداد التخصـص عـن ذلك حيث أن بعض DNases تعمل على ssDNA فقط وأخرى تعمل على dsDNA فقط ولكن يوجد بعض منها يعمل على النوعين أى على ss DNA و ds DNA. يوجد أيضًا نوع آخر من التخصص حيث أن بعض منها تحلل الجزيىء مبتدئة من أحـد طرفـى الجزيىء ومتجهة إلى الداخل وهذه تسـمى بـالنيوكليزات الخارجيـة أى الطرفيـة exonucleases وينتج عنها نيوكليوتيدات مفردة أو جزيئـات ذات عـدد قليـل مـن النيوكليوتيدات oligonucleotides. والعكس صحيح حيث يوجد بعض من الإنزيمات لا تبتدأ من طرف الجزيىء بل تبدأ عملها من داخل الجزيىء ولذلك تسمى نيوكلينيزات

داخلية endonuclease. وبعض من النيوكلينيزات الداخليـة متخصـص فـى كسـر الجزيء فى مواقع بين قواعد نووية معينة دون الأخرى.

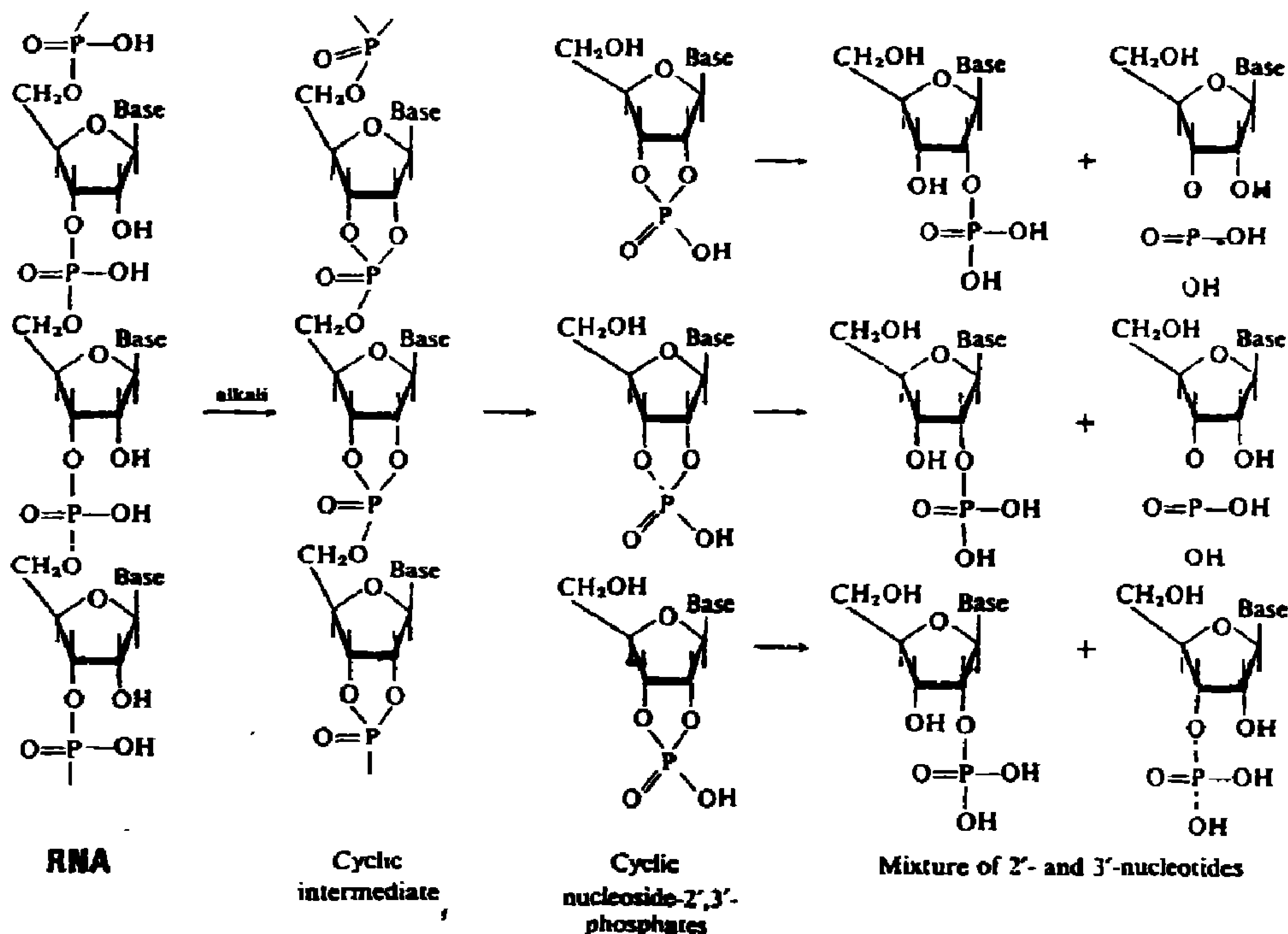
تقوم النيوكلينيزات بوظائف حيوية عديدة وهى فعالة ومفيدة فى دراسة الأحماض النووية معمليًا *in vitro* ومن أمثلة ذلك إنزيمات النيوكلينيزات الداخلية المتخصصة التحديد **restriction endonucleases** وهى عبارة عـن مجموعـة مـن الإنزيمـات متخصصة فى كسر الروابط فى تتابع معين من القواعد.

إنزيم من الطحال **spleenzyme** يحلل دنا إلى نيوكليوسيد-٣- فوسفات وإنزيم من سم الثعابين **venom enzyme** يحلل دنا الى نيوكليوسيد-٥- فوسفات (شكل ٣١).



شكل ٣١ تحلل دنا بإنزيم من الطحال **spleen** وإنزيم من سم الثعابين.

يمكن أن يتحلل رنا بالإنزيمات ويمكن أن يتحلل أيضًا بالقلوية أى بمحلول قلـــوى (شكل ٣٢).



شكل ٣٢: تحلل رنا بالقلوى. خطوات تحلل رنا بالقلوى.

طرق دراسة الجزيئات الكبيرة

Methods Used to Study Macromolecules:

توجد طرق كثيرة تســتخدم فــى دراســة الجزيئــات الكبيــرة الحجــم ومنهــا الكروماتوجرافى chromatography والقياس اللونى spectrophotometry والقــوة الطاردة المركزية العادية centrifugation وقد سبق شرحها بالتفصيل أثناء دراســة القارئ ولذلك سيتم شرح طرق أخرى بالتفصيل وهى:

١ – الطرد المركزى ذو المناطق

Zonal centrifugation:

فى هذه الحالة يتم ملأ أنبوبة الطرد المركزى بواسطة محلول السكروز والذى يقل

تركيز د تدريجيًا من قاع الأنبوبة إلى أعلى. هذا التدريج فى التركيز يحفظ المحلول من الخلط أو الأمتزاج نتيجة التعريض للقوى الميكانيكية أو قوى التفتيت convective disruptive forces. يتم ضبط تركيز وكثافة المحلول المراد أختباره بحيث تكون أقل من كثافة محلول الطبقة السطحية من السكروز فى الأنبوبة. توضع العينة على هيئة طبقة أعلى محلول الأنبوبة. يتم تشغيل الجهاز وتعريض الأنبوبة للطرد المركزى. فى هذا النوع من الطرد المركزى يتم تثبيت الأنبوبة قبل تشغيل الجهاز فى جزء من الجهاز عبارة عن أسطوانة أى جاكت هزاز دورانى swinging bucket rotor. بعد أتمام عملية الطرد المركزى يتم عمل ثقب فى قاع الأنبوبة ويتم تجميع قطرات المحلول من هذا الثقب. تمثل القطرات طبقات متتالية فى الأنبوبة. يتم أختبار وجود الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة وبالتالى يمكن التعرف على تركيز الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة وبالتالى فى المناطق المختلفة من أنبوبة الطرد المركزى. أما عن كيفية التعرف على وجود وتركيز الجزيئات الكبيرة فى القطرات المختلفة يكون بواسطة قياس درجة الأشعاع فى الجزيئات المختبرة radioactivity أو بواسطة درجة إمتصاص الضوء عند طول موجة معينة optical absorbance أو درجة الإصابة أى قدرة إصابة هذه الجزيئات الكائنات الحية biological infectivity أو نشاط الإنزيمات enzymatic activity.

يمكن أن تسمى هذه الطريقة بطريقة الطرد المركزى فى وجود منحدر لتركيز السكروز sucrose gradient centrifugation.

٢ – الطرد المركزى المتزن

Equilibrium centrifugation:

وفى هذه الحالة يستعمل أيضًا منحدر للتركيز من محلول كلوريد السيزيوم CsSl بدلاً من السكروز. تستعمل هذه الطريقة للأحماض النووية والفيروسات عادة. وفى هذه الحالة يتم مزج المحلول المراد أختباره مع كلوريد السيزيوم وبشرط أن تكون كثافة محلول السيزيوم مساوية لكثافة المحلول المختبر (جم/سم^{٣}). أثناء الطرد

المركزى يحدث ترسيب لأيونات السيزيوم Cs^+ لأنها ثقيلة. وحيث أنه يوجد أتوان بين سرعة ترسيب كاتيون السيزيوم فى قاع الأنبوبة وبين الأنتشار لكاتيون السيزيوم ليصبح تركيزه متساو فى أجزاء الأنبوبة ونتيجة لذلك يحدث شبه أتزان بين الترسيب والأنتشار ونتيجة لذلك يوجد منحدر للتركيز لكاتيونات السيزيوم داخل الأنبوبة وحيث يكون أعلى تركيز فى القاع وأقل تركيز على السطح. نتيجة لذلك تنتشر الجزيئات الكبيرة المراد أختبارها تبعًا لمنحدر تركيز كاتيون السيزيوم. ولذلك فإن الجزيئات الكبيرة تتحرك من أعلى الأنبوبة إلى أسفل فى أتجاه القاع وتتوقف فى منطقة معينة من الأنبوبة عندما تتساو كثافة الجزيئات الكبيرة مع كثافة محلول كلوريد السيزيوم. وفى نفس الوقت تتحرك الجزيئات الكبيرة من أسفل الأنبوبة إلى أعلى وحيث تستقر أيضًا فى المنطقة السابقة عندما تتساو الكثافة. ولذلك تكون الجزيئات الكبيرة طبقة رقية فى الأنبوبة ولذلك تسمى هذه الطبقة شريط أو حزمة band وحيث أنها رقيقة فتسمى شريط أو حزمة ضيقة narrow band. ولذلك فإذا أحتوى المحلول المختبر على جزيئات كبيرة الحجم متعدد الأنواع فإن كل نوع سنفصل عن الآخر فى الأنبوبة من مسافة معينة من القاع وتبعًا لكثافته سنجد فى الأنبوبة عدداً من الشرائط أو الحزم مساوية لعدد الأنواع المختلفة من الجزيئات وبذلك يتم فصل هذه الجزيئات عن بعضها. قوة التمييز لهذه الطريقة عظيم أى دقة الفصل عظيم حيث يمكن فصل نفس DNA عن بعضه ولكن الأختلاف الوحيد هو أستبدال ذرة النيتروجين العادية بذرة نيتروجين مشعة أى أستبدال ن١٤ بواسطة ن١٥ ولذلك تتغير الكثافة من ١,٧٠٨ جرام/سم^{٣} فى المحلول العادى إلى ١,٧٢٢ جرام/سم^{٣} فى المحلول المشع أى يمكن الحصول على حزمتين منفصلتين أحداهما للـ DNA العادى والأخرى للـ DNA المشع.

<u>ملحوظة:</u>

أ – يوجد تشابه بين الطريقتين السابقتين حيث أن أحداهما تستعمل منحدر التركيز للسكروز والأخرى تستعمل منحدر التركيز لكلوريد السيزيوم. ولكن فى حالة منحدر

السكروز لا يلعب السكروز دور مباشر فى الفصل أما فى حالة السيزيوم فإنه يلعب دور مباشر فى الفصل. والأختلاف الثانى، حيث أنه فى حالة زيادة مدة الطرد المركزى فى حالة الطرد المركزى ذو المناطق فإنه يحدث ترسيب تام للجزيئات المختبرة ولذلك يجب أن تراعى المدة بدقة أما فى حالة الطرد المركزى المتزنة فإنه بزيادة المدة لا يحدث ترسيب ولا تتأثر الحزم المنفصلة ولذلك فإن زيادة المدة غير مؤثرة إطلاقا على الفصل حيث أن توزيع الجزينات يكون متأثر بحالة الأتزان ولا تؤثر المدة على حالة الأتزان.

ب – من المعروف أن يمكن التعرف على بعض الصفات الهامة للجزينات الكبيرة الحجم بواسطة الترسيب بواسطة قوة طاردة مركزية بسرعة فائقة.

وسرعة حركة الجزينات الكبيرة تتوقف أساسًا على الوزن الجزيئى وشكل الجزيىء تسمى النسبة بين سرعة حركة الجزيىء إلى قوة الطرد المركزى بأسم معامل الترسيب **sedimentation coefficient** وأختصارها S ولذلك فأن:

$$S = \frac{\text{السرعة}}{\text{قوة الطرد المركزية}}$$

وحدة S هى ١٠-١٣ ثانية وتسمى سيفيدبرج svedberg او S1. ولذلك فمن المعتاد الأشارة إلى الجزيىء وله S تساوى ٣٠ بأسم ٣٠ S.

وحيث أن S تتوقف على وزن الجزيىء وشكله ولذلك فإن التغيرات فى S نتيجة للتغيرات فى ظروف التجربة يمكن أن تستعمل كدليل لأكتشاف التغير فى الوزن الجزيىء نتيجة لتجمع الجزيئات أو نتيجة لأنفصالها وبثرتها وأيضًا تستعمل لأكتشاف التغير فى الشكل مثل فك الجزيئات وحتى تصل إلى مرحلة تصبح مستقيمة إلى حد كبير أو العكس إلتفاف الجزيئات على نفسها **folding**.

٢ – الهجرة فى وسط غروي ومجال كهربائى:

Gel Electrophoresis:

تحمل الغالبية العظمى من الجزيئات البيرة شحنة كهربائية ولذلك فأنها تتحرك فى

المجال الكهربائى. عند توصيل قطبى بطارية بطفرى أنبوبة أفقية تحتوى على محلول من البروتين موجب الشحنة فإن الجزيئات الموجبة تهاجر من الطرف الموجب إلى الطرف السالب فى الأنبوبة. يتوقف أتجاه الهجرة على نوع الشحنة وتتوقف سرعة الهجرة على كمية الشحنات وحجم الجزيىء.

وزن الجزيىء لا يلعب دور مباشر فى سرعة الهجرة وذلك على العكس من أختبارات الترسيب فى القوة الطاردة المركزية.

ومن أكثر أنواع هذه الهجرة هى الهجرة فى وسط غروى gel ولذلك تسمى gel electrophoresis. يمكن ضبط هذا الأختبار بحيث تكون سرعة الهجرة متوقفة على الوزن الجزيئى للجزيىء الغروى المستعمل عادة فى هذه التجارب عبارة عن أجاروز agarose أو بولى أكريل أميد polyacrylamide وفى حالة تشغيل الجهاز يتولد تيار كهربائى عبر الغروى وتتخلل جزيئات DNA فى أثناء هجرتها الثقوب الدقيقة الموجودة فى الغروى. يعتبر DNA سالب الشحنة نتيجة لوجود مجاميع الفوسفات على العمود الفقرى للجزيىء. ولذلك يهاجر DNA إلى القطب الموجب للجزيىء. وحيث أن الغروى عبارة عن شبكة متداخلة من الجزيئات فإن الجزيئات تهاجر فى الغروى عبر الثقوب أو الفراغات الموجودة فى الشبكة. ولذلك فأن حركة وهجرة الجزيئات فى الغروى تتوقف على حجمها حيث أن الجزيئات الصغيرة تهاجر أسرع من الجزيئات الكبيرة وأيضًا تتوقف على التركيب الثالثى tertiary structure الحلقة الزائدة الحلزنة أو المرتخية أو المفتوحة أو الشكل الشريطى للجزيىء. وفى حالة DNA زائد الحلزنة supercoiled يكون منضغط تمامًا very compact ولذلك يهاجر فى الغروى بسرعة كبيرة ويكون الأسرع فى الهجرة عنه فى الحالات الأخرى. وفى حالة DNA الشريطى فأن سرعة الهجرة تزداد بقلة الوزن الجزيىء. نتيجة للهجرة تتكون شرائط أو حزم فى الغروى يمكن التعرف على هذه الحزم بأستخدام صبغات معينة أو بأستخدام مركبات مضيئة مثل حالة الفلورة نتيجة لوجود بروميد الإثيديم (شكل ٣٣).

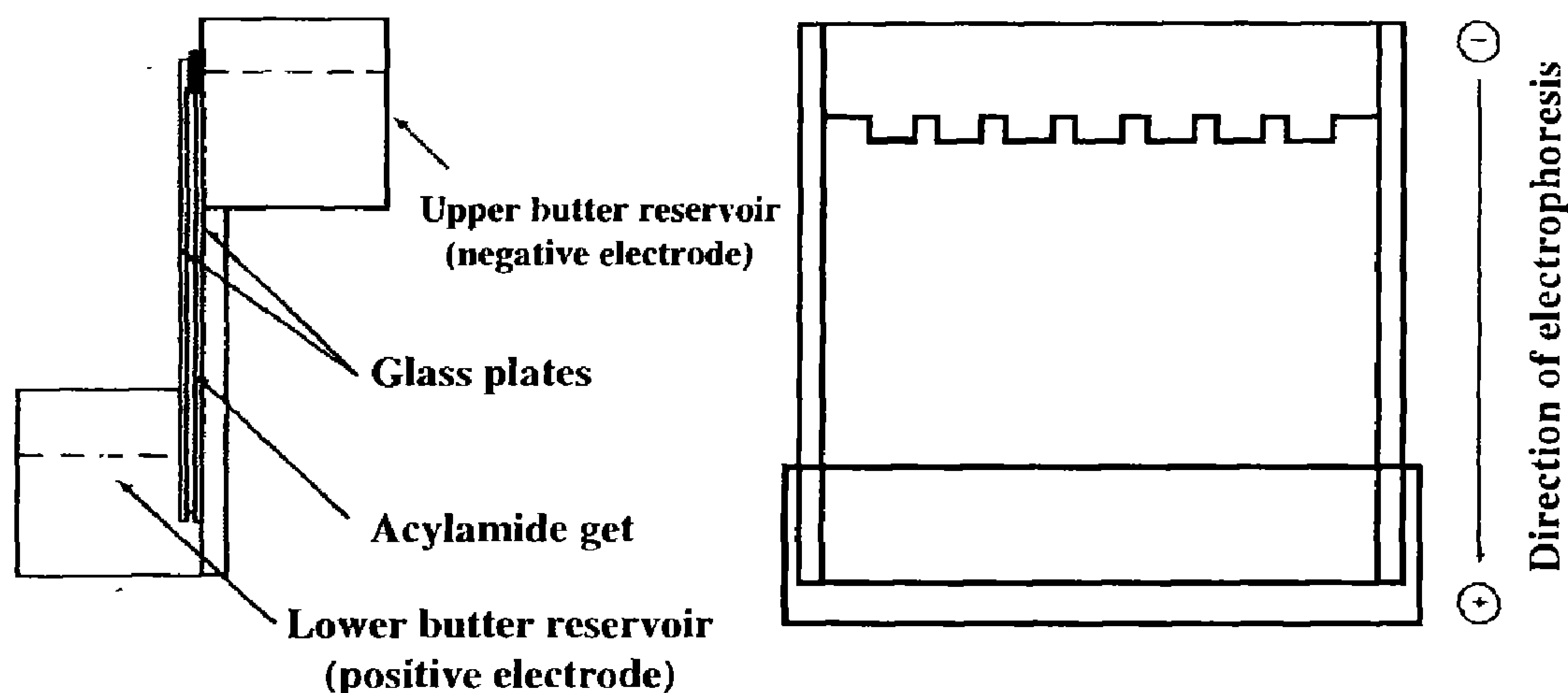


شكل ٣٣: الهجرة الكهربائية فى الأجاروز لدنا الفاج لامدا للبكتيريا إ. كولاى والى يتم هضمه (تحليله) بواسطة إنزيم القطع المحدد .r. e والذى يسمى Eco R1 والذى يقطع دنا لامدا إلى ستة شظايا. إتجاه الهجرة من أعلى إلى أسفل. يصبح دنا مشع أى مضىء ويمكن رؤيته لمعاملته ببروميد الإثيديم.

يوجد نوع خاص من هذه الطريقة أو التحليل يسمى pulsed field gel electrophoresis. بأستعمال gel electrophoresis العادية فأنه يمكن فصل جزيئات DNA أقل فى حجمها من ٢٠ kb ولكن فى حالة الجزيئات الأكبر حجمًا لا يمكن فصلها لأنها لا تتخلل مسام الغروى لكبر حجمها ولذلك لا يحدث لها هجرة أى حركة (شكل ٣٤، ٣٥).

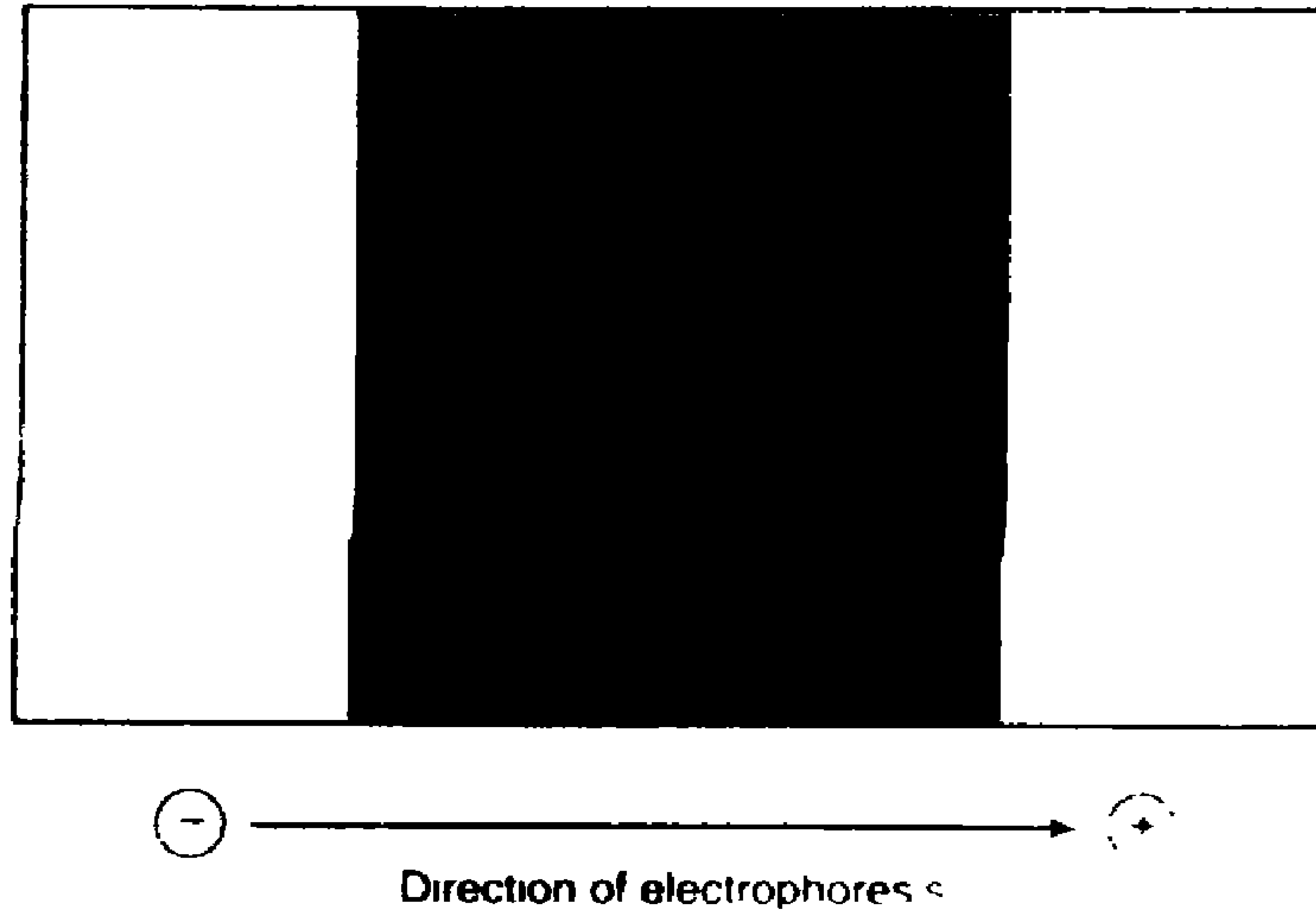
فصل جزيئات DNA الكبيرة يتم بواسطة pulsed fieldgel electrophoresis (PFGE). ولذلك فإن جزيئات DNA الكبيرة التى تتراوح بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠٠ kb يمكن فصلها بواسطة PFGE. وفى هذه الطريقة أثناء التجربة يتم تغيير أتجاه الحقل

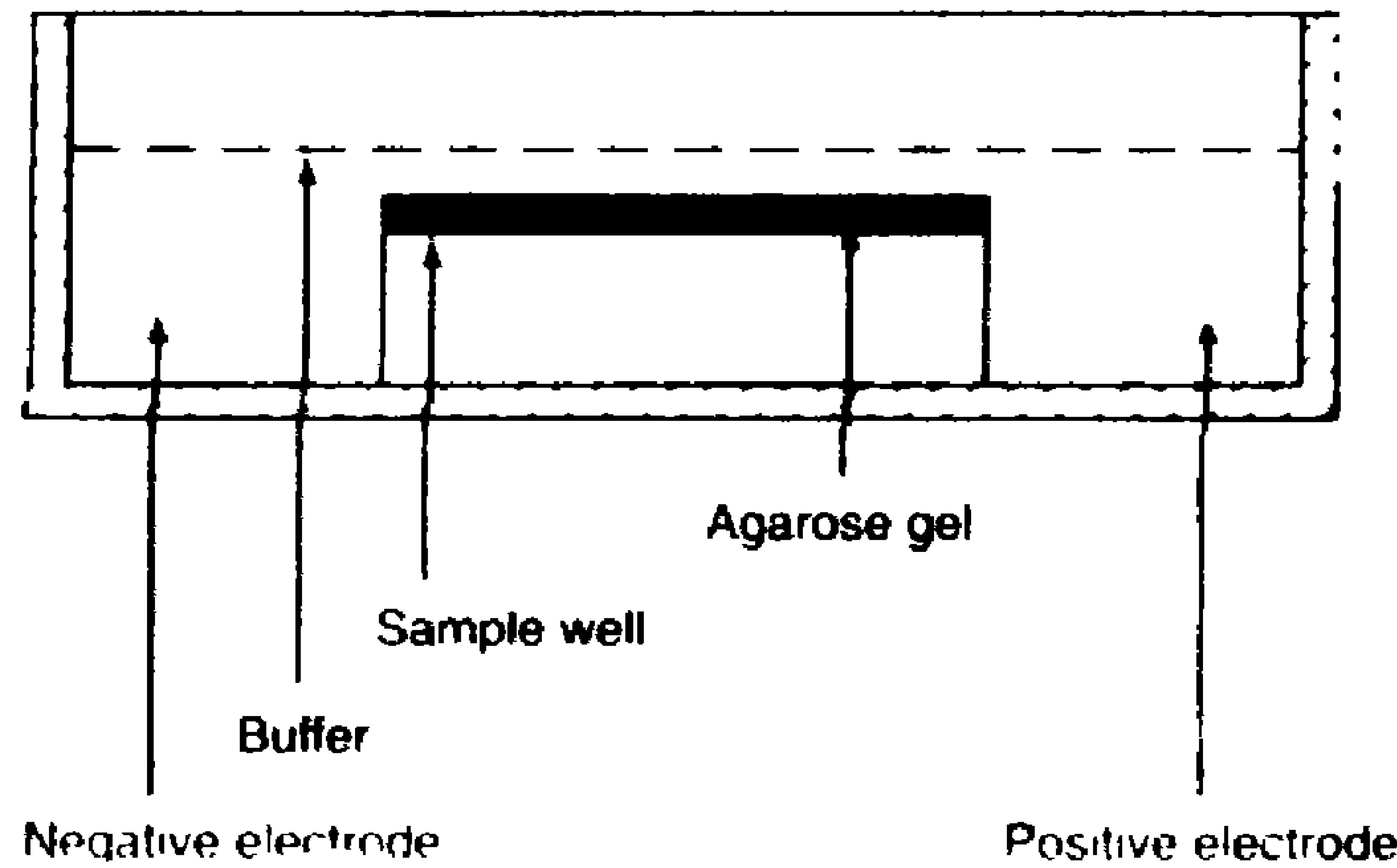
الكهربائى electric field دوريًا على فترات. وجد أنه نتيجـــة لـــذلك تحـــدث هجـــرة لجزيئات DNA الكبيرة ويتم فصلها فى حزم ولكن غير معروف حتـــى الآن آليـــة أو ميكانيكية حدوث ذلك أى أن الأساس العلمى لكيفية حدوث وســـبب حـــدوث هجـــرة الجزيئات وفصلها غير معروف ولكن يعتقد أن تغيير أتجاه الحقل الكهربـــائى يســـبب إعادة توجيه للجزيئات فى الغروى وبذلك تنحشر وتتحرك snake خلال ثقوب ومسام الأجاروز.



شكل ٣٤: الهجرة الكهربائية الرأسية فى بولى أكربل أميـــد plyacrylamide والـــتى تستخدم فى فصل أجزاء صغيرة من دنا.

Vertical gel set-up for polyacrylamide electrophoresis





شكل ٣٥: الهجرة الكهربائية الأفقية فى الغروى الآجاروز. تستخدم فى حالة الشـــظايا الكبيرة نسبيًا من دنا. غروى الأجاروز يتم غمره بالمنظم **buffer**.

جزيئات DNA وخاصة كبيرة الحجم تكون حساســة وتتكســر أو تتجــزأ بــالجز shearing. يمكن تلافى تقصف وتجزأ DNA بواسطة طمر embedding الخلايا فـــى أجاروز قبل التحلل lysis. أثناء وجود الخلايا فى مكعبات صغيرة من الأجاروز فـــإن الخلايا تتحلل برقه gently ويتحرر منها DNA عادى غير متقصف. يمكــن هضــم DNA فى مكعبات الأجاروز بواسطة restriction enzymes. بأســتخدام restriction

enzymes لها القدرة على هضم جزيئات الـ DNA أى قطع جزيئات DNA على مسافات متباعدة أى قطع مرة واحدة لكل 10^3 إلى 10^4 kb فإنه يمكن عمل خرائط restriction maps للكروموسوم بإستعمال PFGE يمكن أيضًا عمل خرائط للجينات المنقولة cloned genes على خرائط restricion maps (يمكن تسميتها مجازًا خرائط القطع) بأستعمال طريقة التهجين بين DNA و DNA – DNA-DNA hybridization. وبهذه الطريقة يمكن عمل خرائط للكروموسومات لكثير من الكائنات الحية.

يوضع البولى أكريل أميد بين لوحين زجاجيين بينهما فاصل رقيق على الجانبين ويوضع مشط comb على القمة والذى يكون آبار العينة sample wells. بعد تجمد البولى أكريل أميد يتم إزالة الفاصلين والمشط. توضع العينة أو العينات فى الآبار مع وضع الألواح الزجاجية فى الجهاز. يتم صب المحلول المنظم buffer فى الحجرة العليا والحجرة السفلى ثم يتم توصيل الجهاز بالكهرباء ويكون الإلكترود السالب فى القمة والإلكترود الموجب فى القاعدة أى الحجرة السفلية.

بعد الفصل يتم إزالة الغروى من الجهاز ويتم نقعه فى محلول من بروميد الإثيديم. هذه المعاملة تسبب إشعاع دنا ويمكن رؤيته فى وجود الأشعة فوق البنفسجية.

بعض الحقائق والخواص الهامة لرنا ودنا :

أنظر الجداول (جداول أرقام ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤).

جدول ١ : بعض الحقائق والخواص الهامة لدنا.

الخاصية	في داخل النواة أو فى منطقة شبه النواة (البكتيريا وغيرها)		فى داخل عضيات الخلية مثل الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء	خارج الخلية فى بعض أجزاء من دورة الحياة	
النوع	دنا الكروموسوم			فيروسات دنا (التى تهاجم البكتيريا والحيوان عدا التى تهاجم النبات)	
	البكتيريا	النباتات والحيوانات الراقية			
عدد القواعد التقريبى	٤×١٠^{٦} زوج قاعدة	٥×١٠^{٩} زوج قاعدة فى الطاقم الوراثى	$١٠^{٤}$ زوج قاعدة	فيروسات صغير ٥×١٠^{٣} زوج قاعدة	فيروسات كبيرة تصل إلى $١٠^{٥}$ زوج قاعدة
إرتباطها بالبروتين	بكميات قليلة من البروتين فقط	بكميات كبيرة من البروتين (عادة تكون قاعدية وأحيانًا متعادلة أو حامضية)	مرتبطة	نعم مرتبطة	نعم مرتبطة
الوظيفة وملاحظات	تخزين المعلومات الوراثية فى الخلية ٩٩٪ أو أثر فى دنا		أحد مكونات دنا قليلة التركيز فى الخلية	تحمل جميع الخواص الوراثية الأساسية للفيرس	

جدول ٢ : بعض الحقائق والخواص الهامة لرنا.

الخاصية	فى داخل النواة أو فى منطقة شبه النواة (البكتيريا وعددها)		فى داخل عضيات الخلية مثل البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا	فى الريبوسوم أو حوله		خارج الخلية جزء من دورة الحياة
النوع	رنا رسول messenger RNA m-RNA	رنا النوية nucleolar RNA n-RNA (فى حقيقيات النواة فقط)	تشابه رنا الريبوسوم	رنا الريبوسومى r-RNA	رنا الناقل t-RNA	فيروسات رنا (نباتات وحيوانات وبكتيريا)
عدد القواعد التقريبى	10^{3} – 10^{4} زوج قاعدة			s5 s16 s23 ١٢٠ ١٦٠٠ ٣٢٠٠	٧٠–٨٠ زوج قاعدة	10^{3}–10^{4} زوج قاعدة
إرتباطها بالبروتين	أساس لتخليق البروتين			نعم ترتبط	أساس لتخليق البروتين	نعم ترتبط مع وجود إستثناءات
الوظيفة وملاحظات	يخلق وينتقل للريبوسوم	يخلق فى النواة ويتجمع فى النوية		موقع تخليق البروتين	نقل الحامض الأمينى المنشط إلى الريبوسوم	يحمل جميع الخواص الوراثية الأساسية للفيروس

Table 4 The various types of nucleic acid

SITE	Inside the nucleus (or nuclear zone in those cells, e.g. bacteria that do have a clearly defined nucleus, see "procaryotes" and "eucaryotes")		The remainder of the cell: Within organized structures, such as chloroplasts and mitochondria	The remainder of the cell: Not within organized structures	Outside the cell (for part of the time)
DNA					
Type	**Chromosomal DNA (bacteria)**	**Chromosomal DNA (higher cells)**			**DNA of viruses (those attacking some animals and bacteria, but not plants)**
Approx. number of bass	**~ 4x 10^6 base pairs**	**~5x 10^9 base pairs in total chromo-**	~ 10^4 base pairs		Small viruses ~5x 10^3; Large viruses up to 10^5
Topology		(not known if linear or circular)	or [illegible]		φX 174 or φX 174; λ phage; T4 phage; T4 phage
Associated with Protein?	Small quantities of protein only	Large quaantities of protein (mostly basic but some neutral or acidic)	Yes		φX 174; T4 phage; Yes
Function and remarks	Storage of genetic information in the cell 99% or more of the DNA in the cell		Minor component of DNA of cell		Carries all essential genetic features of the virus

Table 3 The various types of nucleic acid

SITE	Inside the nucleus (or nuclear zone in those cells, e.g. bacteria, that do have a clearly defined nucleus, see "procaryotes" and "eucaryotes", Ch 10)		The remainder of the cell: Within organized structures, such as chloroplasts and mitochondria	The remainder of the cell: Not within organized structures		Outside the cell (for part of the time)
RNA						
Type	Messenger RNA (m- RNA)	Nucleolar RNA (n- RNA; eucaryotes only)	Ribosome- like objects (see next column) are found in these structures	Ribosomal RNA (r-RNA)3 types:* 55 165 235	Amino-acyl transfer RNA (t- RNA)	RNA of viruses (plant viruses, some animal and bacterial viruses)
Approx. number of bass	10^3- 10^4			120 1600 3200	70 - 80	10^3- 10^4
Topology						Usually except when replicating but occasionally Wound Tumour Virus
Associated with Protein?				Yes		Yes (exceptions exist)
Function and remarks	m- RNA is synthesized here, then migrates to the ribosome (q.v.) carrying the genetic information required for protein synthesis	Non- messenger RNA is synthesized in the nucleus and is assembled in a zone (visible only during some stages the life cycle of the cell) called the nucleolus. Ribosomal RNA (q.v.) predominates		Site of synthesis of protein	Transfers activated amino- acid to ribosomal- messenger RNA complex	As for DNA. Secondary and tertiary structure controlled by the virus protein

* These are sedimentation coefficients for RNA from bacterial ribosomes. Ribosomes from higher cells contain RNA with slightly different sedimentation coefficients (see p 438).

الباب الثاني

البروتينات

البـــروتينـــات Proteins

يعتبر جزيىء البروتين عبارة عن تركيب ثلاثى الأبعـــاد three-dimensional structure ويتحدد هذا التركيب بواسطة تتابع الأحماض الأمينية. تعتبر البروتينات أساسية فى الهندسة الوراثية والوراثة ووراثة الميكروبـــات والبيولوجيـــا الجزيئيـــة ولذلك سنشرحها بشئ من التفصيل.

التركيب الكيماوى لعديد الببتيدات :

Chemical Structure of a Polypeptide Chain

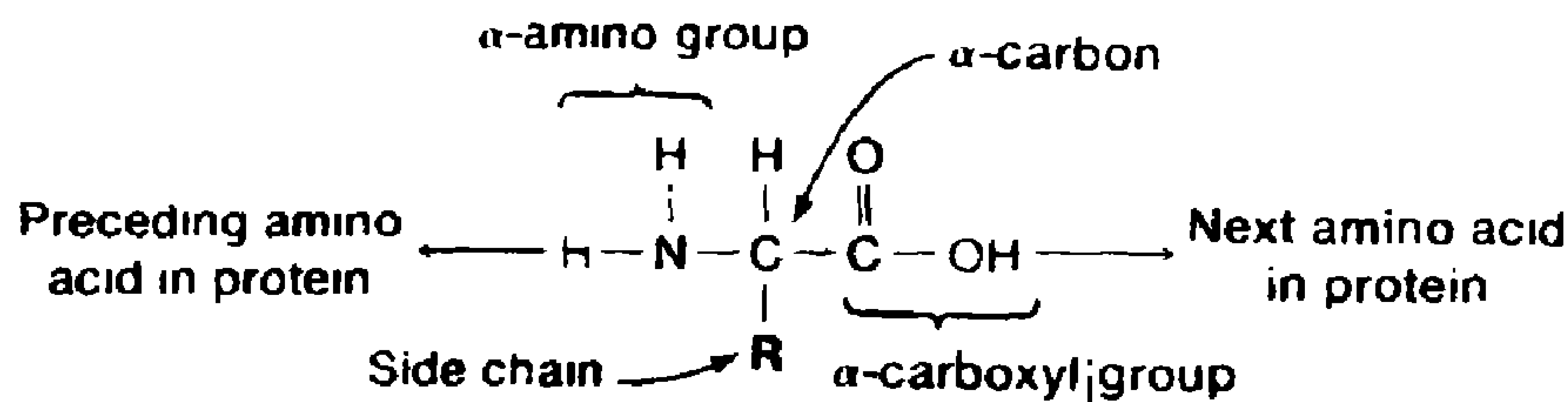
يتكون جزيىء البروتين من سلسلة أو أكثر من عديد الببتيدات. والوحدة البنائيـــة فى عديد الببتيدات هى عبارة عن عشرون حامض أمينى مختلف. يتكـــون الحـــامض الأمينى فى الغالبية العظمى من الأحوال من ذرة كربون تسمى ألفا كربون α carbon ويلتحم بها مجموعة أمين ومجموعة كربوكسيل وسلسلة جانبية يطلق عليهـــا R أى Rgroup (شكل ٣٦ والذى يختلف عن ذلك فقط هـــو الحـــامض الأمينـــى بـــرولين. وتختلف السلسلة الجانبية فى نوعها فقد تكون حامضية أو قاعدية أو كارهة للماء أو تحتوى على مجموعة sulfhydryl. وكل حامض أمينى يمكن تحديد خواصخ الطبيعية والكيميائية بالسلسلة الجانبية. وفى سلسلة عديد الببتيدات يرتبط الحـــامض الأمينـــى بمجموعة أمين مع مجموعة كربوكسيل حامض أمينى آخر ويتكـــون بـــذلك رابطـــة ببتيدية وينتج عن ذلك خروج جزيىء الماء وتكـــوين مجموعـــة ببتيديـــة peptide group (شكل ٣٧) ولذلك فإن سلسلة عديد الببتيدات تتكون مـــن بلمـــرة الأحمـــاض الأمينية وحيث أن ذرات ألفا كربون ومجاميع الببتيدات تتبادل مـــع بعضـــها لتكـــون عمود فقرى للجزيىء شريطى linear ويبرز من العمود الفقرى نتوءات جانبية مـــن ذرة ألفا كربون عبارة عن بقية جزيىء الأحماض الأمينية دون أن تشارك فى تركيب العمود الفقرى (شكل ٣٨). يشير اللفظ شريطى linear إلى أن العمود الفقرى غيـــر

متفرع ولكن يكون مطوى كثيرًا أى أن شريطى هنا يعنى عدم التفريع وليس الألتواء أو الطى. يتكون عديد الببتيدات المثالى من سلسلة تحتوى ٣٠٠-٧٠٠ حامض أمينى ولها وزن جزيىء يتراوح بين ٣٠,٠٠٠ إلى ٧٠,٠٠٠ ولكن يمكن أن توجد سلاسل أقل فى طولها من ذلك كما يمكن أن تكون أطول من ذلك. يمكن أن تحتوى السلسلة على أكثر من ألف حامض أمينى ولكن ذلك نادرًا. كثيرًا من البروتينات تحتوى على عديد من الببتيدات وفى هذه الحالة قد يصل الوزن الجزيئى للبروتين إلى ٥٠٠,٠٠٠.

التركيب الطبيعى لعديد الببتيدات:

Physical Structure of a Polypeptide Chain

لا تعتبر سلسلة عديد الببتيدات مستقيمة تمامًا حيث أن الروابط بين C-N وبين C-C وحيث تشارك فيها ألفا كربون غير مستقيمة ولذلك ينتج عن ذلك شكل زجزاجى (شكل ٣٨). وفى الحقيقة لا يوجد عديد الببتيدات مستقيم بل يكون ملوى بدرجة معقدة كما سيتم شرحه.



شكل ٣٦: التركيب الأساسى لألفا حامض أمينى OH α-amino على الطرف ف اليمين، H على الطرف ف الشمال يستخدمان لعمل الرابطة الببتيدية. لاحظ ذرة الكربون ألفا α-carbon.

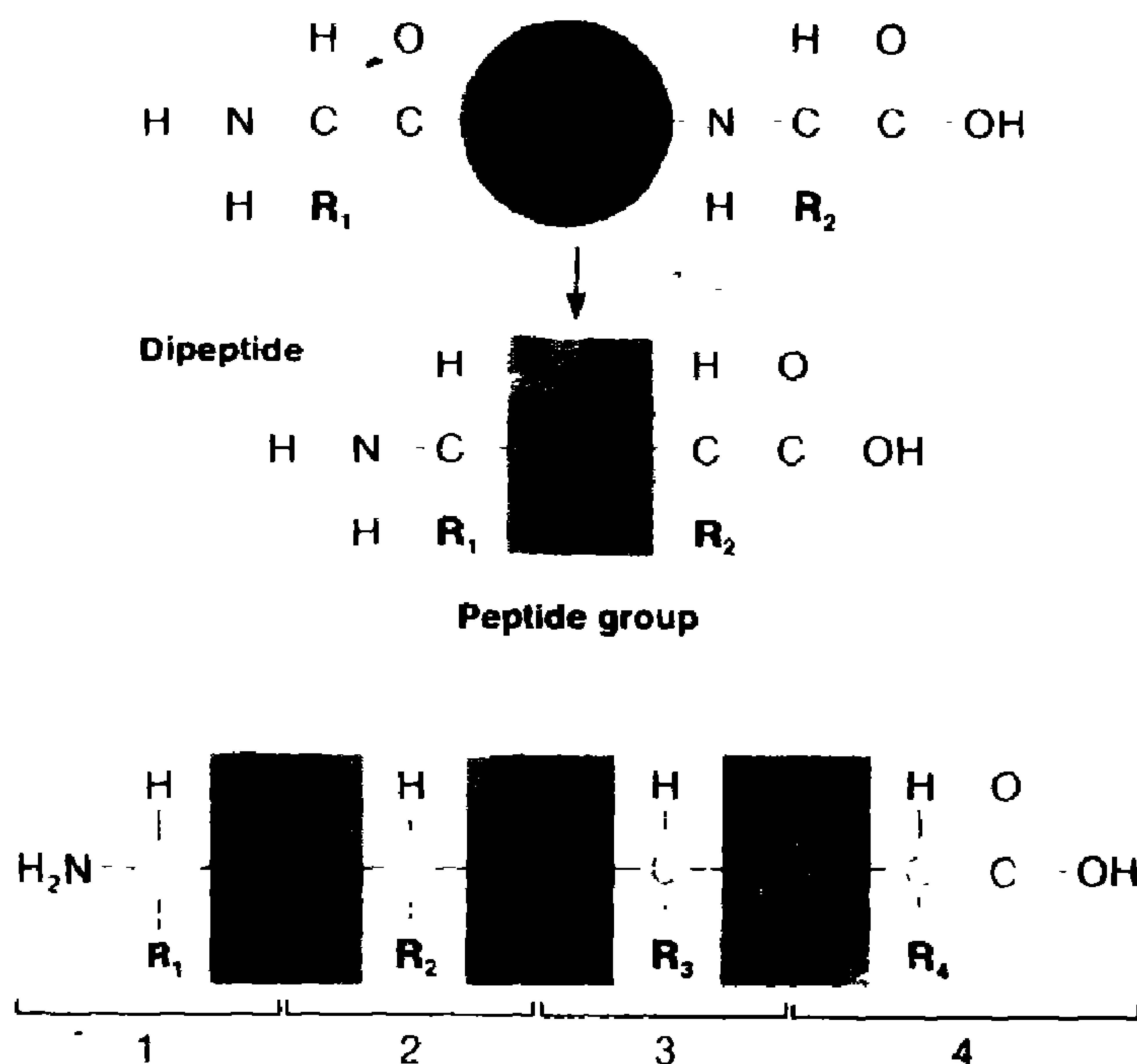
طى سلسلة عديد الببتيدات:

Folding of a Polypeptide Chain

توجد قواعد عديدة تتحكم فى كيفية طى عديد الببتيدات وهى كما يلى:

١ – تعتبر الرابطة الببتيدية لها جزئيا خواص الروابط المزدوجة ولذلك تميل إلى

أن تكون مستوية وفى مستوى واحـــد constrained to be planar. يحـــدث دوران حر فقط بين ذرة كربون ألفا ومجموعة الببتيد. ولذلك فـــإن سلســـلة عديد الببتيدات مرنة flexible نسبيًا ولكنها ليست مرنة تمامًا وحيث يكـــون فى حالة المرونة التامة أن جميع الروابط تظهر حالة دوران حر.

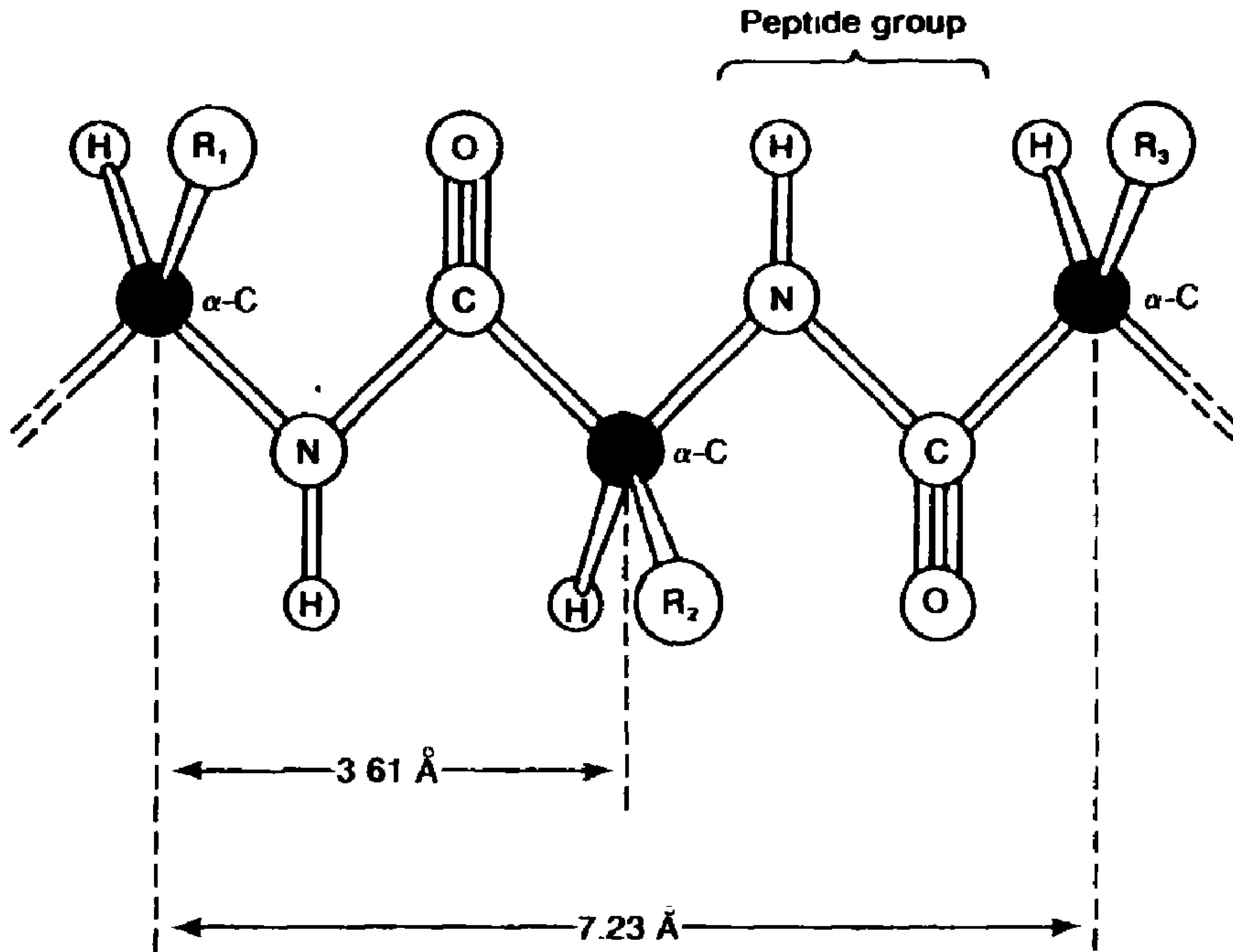


شكل ٣٧: تكوين ثنائى الببتيد dipeptide من إلتحام حامضين أمينيين وخروج المـــاء وتكوين رابطة ببتيدية وتكوين مجموعة ببتيدية peptide group.
الشكل السفلى رباعى الببتيد tetrapeptide يوضح ألفا كربـــون ومجـــاميع ببتيديـــة α carbon and peptide groups.

٢ – السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية لا يمكن أن تتداخل overlap مع بعضها. ولذلك فإن ترتيب تكوين العمود الفقرى للجزيىء لا يكون أعتباطى تمامًا أو أعتباطى حقيقيًا random truly حيث أن بعـــض التكوينـــات والتوجيهـــات certain orientations تكون غير ممكنة أى محال حدوثها.

٣ – وجود مجموعتين ذات شحنات متماثلة لا يمكن أن تكون قريبة من بعضـــها.

ولذا فإن الشحنات المتماثلة تميل إلى أن تسبب تمدد أو أتساع extension السلسلة.



شكل ٣٨: تركيب إفتراضى لجزء من سلسلة عديد البتيات. طول كل amino acid residue هو ٣٦,١ نانومتر. وكل مسافة الوحدة أو كل مسافة مكررة repeat distance ٧٢,٣ نانومتر.

٤ – الأحماض الأمينية التى تتميز بأن لها سلسلة جانبية قطبية تميل إلى أن تكون على سطح البروتين وملاصقة للماء.

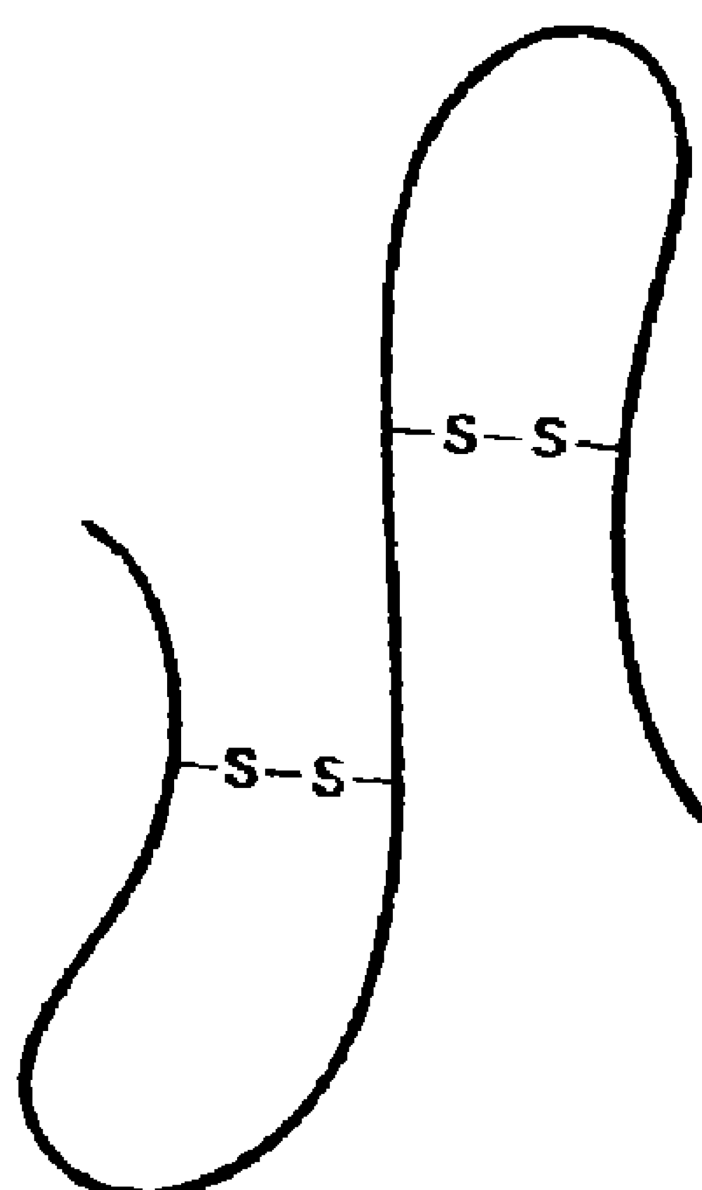
٥ – الأحماض الأمينية التى تتميز بأن لها سلسلة جانبية غير قطبية تميل إلى أن تكون داخلية وتميل السلاسل الجانبية الكارهة للماء فى أن تتجمع مع بعضها فى عناقيد.

٦ – تميل الروابط الإيدروجينية أن تتكون بين الأوكسجين مرتبط بذرة كربون carbonyl oxygen لرابطة ببتيدية وبين الإيدروجين المرتبط بذرة النيتروجين فى رابطة ببتيدية أخرى. تسبب هذه الروابط الإيدروجينية نشوء

نوعين رئيسيين من عديد الببتيدات وهما تسميان حلزون ألفا α -helix وتركيب بيتا β-structure.

٧ – تتفاعل المجموعة SH أى sulfhydryl للحامض الأمينى سستئين مع نفس المجموعة لحامض أمينى سستئين تال لتكوين رابطة تعاونية بين ذرة الكبريت وذرة الكبريت الأخرى أى S-S وتسمى هذه الرابطة disulphide. تسبب هذه الروابط ضغط على تركيب جزيىء البروتين. وقد وجد فى خلايا البكتيريا حيث يعتبر السيتوبلازم بيئة مختزلة reducing environment فإن سيتوبلازم البكتيريا يمنع تكوين هذه الرابطة فى بروتين السيتوبلازم ولكن يمكن أن توجد هذه الرابطة فى البروتينات المفرزة (شكل ٣٩).

وحيث أن تركيب البروتين يتحدد بواسطة تتابع الأحماض الأمينية فإن الإخلال بهذا التتابع من شأنه تغيير تركيب البروتين كله وذلك بإحلال حامض أمينى بآخر أى أستبدال حامض أمينى بحامض آخر أى أستبدال حامض أمينى غير قطبى بواسطة حامض أمينى قطبى. ولكن أحيانًا أخرى قد يكون العكس حيث لا يؤثر الأستبدال على تركيب البروتين ومثال ذلك أستبدال حامض أمينى غير قطبى بآخر غير قطبى أو يكون الأستبدال له تأثير ضعيف.



شكل ٣٩: سلسلة عديد الببتيدات توضح أربعة جزيئات سستئين تكون رابطتين ثنائية السلفيد two disulfide bond.

شكل سلسلة عديد الببتيدات ذو الثلاثة أوجه three-dimensional shape يتحـــدد نتيجة للتوازن بين السبعة عوامل السابق ذكرها. يوجد عامة بين سلاسل مختلفة من عديد الببتديات وأيضًا فى أجزاء مختلفة من السلسلة الواحدة من عديــد الببتيــدات تماثل جيومترى منتظم على هيئة صفوف geometrical regular arrays تتكون هذه الصفوف نتيجة لوجود روابط إيدروجينية بين مجاميع ببتيدية مختلفـــة كمـــا ســـيتم شرحه فى الجزء التالى.

يعتبر طى جزيىء البروتين من الأهمية بمكان حيث أن خواص أو غالبية خواص البروتين تتحدد نتيجة لوجود الشكل ذو الثلاثة أوجه. ومثال ذلك أن قدرة الإنزيمـــات على التفاعل وخاصة فى مواقع التفاعل catalytic sites تتحدد بواسطة قدرتها علـــى تقريب وتجميع وتركيز أجزاء كثيرة متباعدة من سلسلة عديد الببتيد. وجد أيضًـــا أن أختلال نظام طى جزيىء البروتين بأى طريقة يسبب فقد الجزيىء لخواصه الحيوية.

دور الروابط الإيدروجينية فى تكوين حلزون ألفا وتركيب بيتا

Hydrogen-Bonded Conformations: The α-Helix and β Structure

فى غياب التفاعلات أو حتى أى تفاعل بين الأجزاء المختلفة لسلســلة الببتيــدات فإنه يحدث دوران حر free rotation لكل رابطة موجودة عــدا الرابطــة الببتيديــة ويحدث نتيجة لذلك عدد كبير من التغيرات فى السلسلة وتعرف هذه التغيــرات فـــى مجموعها بأسم حلزون أعتباطى random coil. يمكن أن تحدث تفاعلات فى سلسلة عديد الببتيدات وذلك بتكوين رابطة إيدروجينية بسهولة بـــين ذرة إيـــدروجين فـــى مجموعة الببتيـــد peptide group أى N-H وبـــين ذرة أوكســـجين فـــى مجموعـــة carbonyl فى ببتيد آخر.

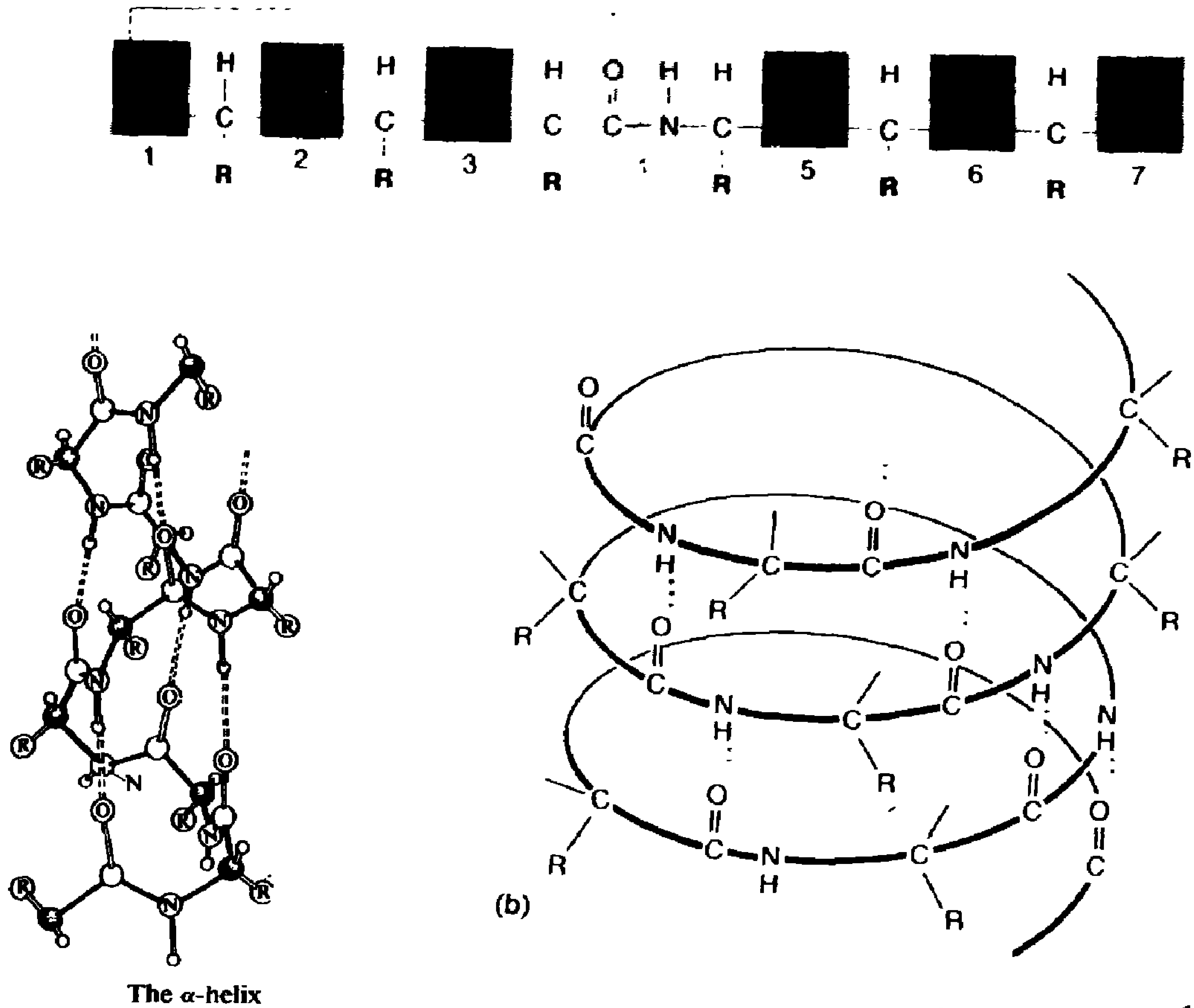
وفى حالة غياب جميع التفاعلات الجانبية الأخرى side chain interactions فإن أكثر تركيب ثابت ذو روابط إيدروجينية من هذا النوع يسمى حلزون ألفا α-Helix.

ويتميز حلزون ألفا بأن سلسلة عديد الببتيدات تصبح حلزونية الشكل وتصبح ثابتة

فى شكلها نتيجة لوجود روابط إيدروجينية بين مجاميع الببتيـدات peptide groups. يوجد نظام خاص وترتيب لهذه الروابط بحيث أن كل مجموعة ببتيدية تتصل بواسطة روابط إيدروجينية بمجموعتين ببتيديتين أخريتين أحداهما تسـبق هـذه المجموعـة بثلاث وحدات أى مجاميع ببتيدية والأخرى تلى هذه المجموعة بثلاث مجاميع ببتيدية (شكل ٤٠). يكون لهذا الحلزون ألفا مسافة ثابتة بين الأجزاء المتماثلة فـى لفتـى حلزون متتاليتين وتسمى مسـافة التكـرار repeat distance وهـى ٥,٤ نـانومتر وللحلزون قطر طوله ٢,٣ نانومتر ويحتوى الحلزون فى اللفة الواحدة ٣,٦ حامض أيامينى ولذلك يعتبر هذا الحلزون أكثر أحكامًا tighter من حلزون DNA.

يعتبر الشكل حلزون ألفا لعديد الببتيدات هو الشكل المفضل لعديد الببتيدات حيـث أن جميع وحداته monomers متماثلة التوجيه وكل وحدة تكون روابط إيدروجينيـة كما فى الوحدات الأخرى. وفى حالة سلسلة عديد الببتيدات والتى تتكون من الحامض الأمينى جليسين فأنها تسمى عديد الجليسين polygycine وهى تفتقر إلى المجموعة الجانبية حيث أن الحليسين ليس له مجموعة جانبية وبدلاً منها ذرة إيدروجين ولذلك لن يكون لها أى تفاعلات جانبية أخرى ولذلك فأنها تكون حلزون ألفا فقط أى تـدخل فى تركيب α مع عدم وجود أى تفاعلات جانبية.

أما عن دراسة حلزون عديد الليسين polylysine فأنه يوضح كيـف أن البيئـة تؤثر على تركيب البروتين. وحيث أن الليسين سلسلة جانبية تحتوى على مجموعـة NH_2 أخرى فأن هذه المجموعة تصبح مشحونة فى درجة pH معينة أو درجات pH معينة وغير مشحونة فى درجات أخرى. عندما تكون هذه المجموعة الأمينية غيـر مشحونة أنها تكون حلزون ألفا وعندما يتغير pH البيئة وتصبح السلسـلة الجانبيـة مشحونة فأنه يحدث تنافر نتيجة لوجود الشحنات المتماثلـة والتـى تحطـم الشـكل الحلزونى ويصبح الجزيىء غير حلزونى ويصبح تقريبًا مستقيم أو ممتـد أى غيـر حلزونى.



شكل ٤٠ : خواص ألفا helix:

(a) موقع الرابطتين الإيدروجينيتين والتى تحدث فى المجموعة الببتدية رقم ٤. أرقام المجاميع الببتدية موضحة أسفل الشكل.

(b) α-helix تم رسم فى ثلاثة أبعاد three dimensions ليوضح كيف أن الروابط الإيدروجينية تسبب ثبات التركيب. النقط توضح مواقع الروابط الإيدروجينية. ذرات الإيدروجين التى لاتدخل فى تركيب الروابط الإيدروجينية تم حذفها لسهولة التوضيح.

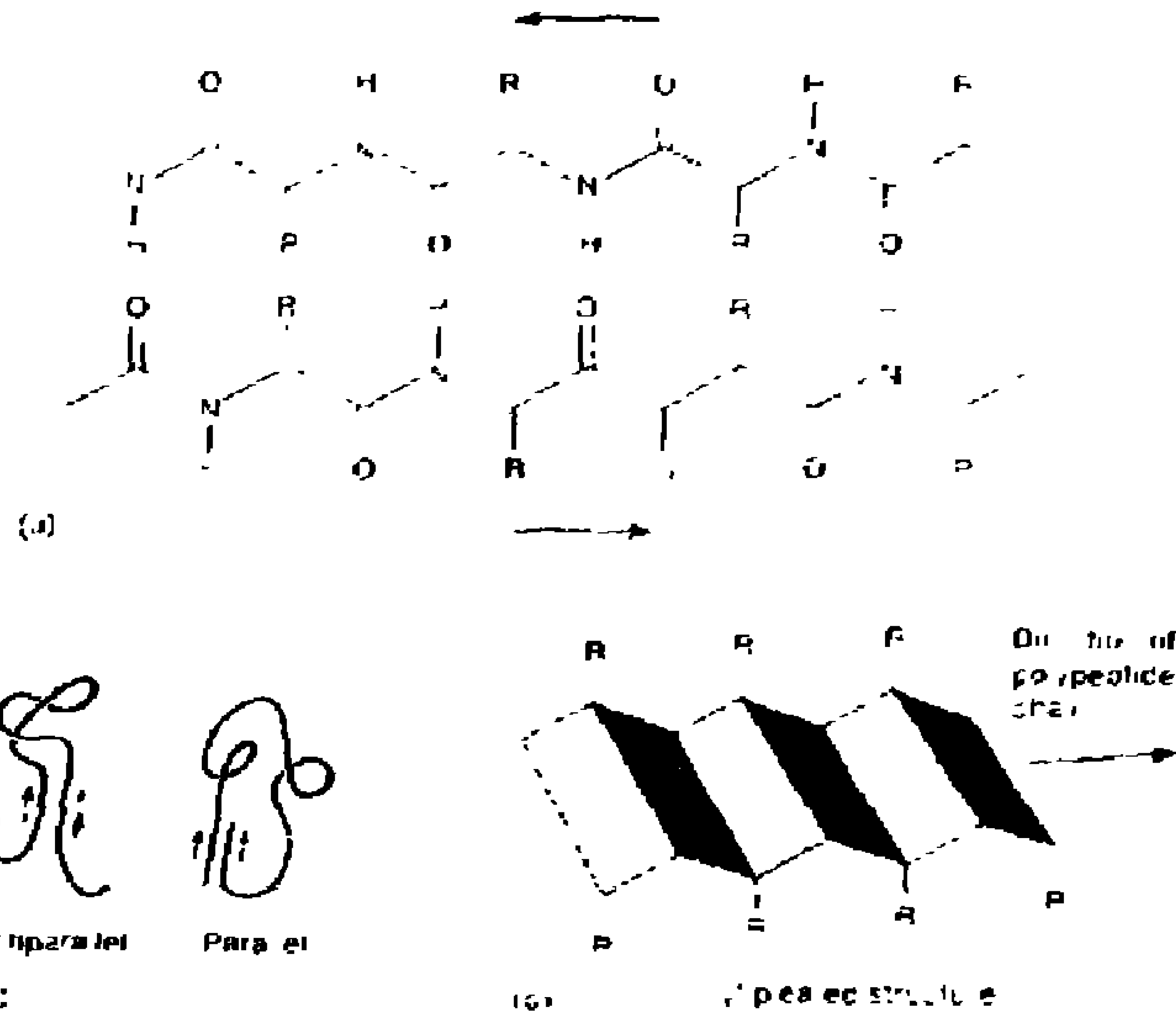
وفى حالة البروتينات التى تحتوى على تركيب حلزونى لعديد الببتيدات ويمتد هذا الحلزون لمسافة طويلة يصبح البروتين صلب ليفى rigid and fibrous (ليست جميع البروتينات الصلبة الليفية تتكون من حلزون ألفا أى أنه يمكن أن توجد بروتينات صلبة وليفية لا تتكون من سلاسل حلزون ألفا). يوجد هذا النوع من البروتين فى كثير من البروتينات التركيبية مثل ألفا كيراتين أو كيراتين ألفا α-keratin الموجود فى الشعر والأظافر والحوافر.

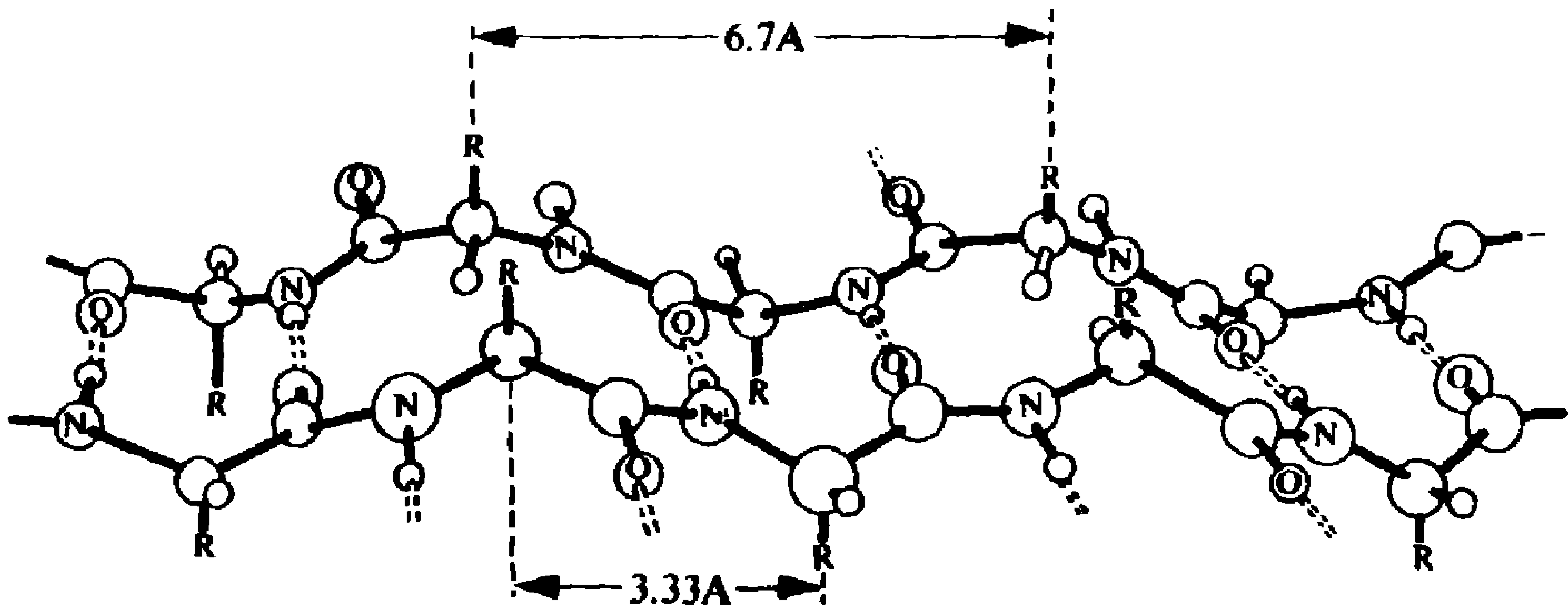
يوجد نوع آخر من عديد الببتيدات يتكون نتيجة لوجود الروابط الإيدروجينية يسمى تركيب بيتا β-structure وفى هذه الحالة يكون الجزيىء ممتد مموج مفرود غير حلزونى ومسافة التكرار repeat distance ها هى ٧ نانومتر ويوجد روابط إيدروجينية بين وحدات الببتيدات الموجودة فى جزيئات عديد الببتيدات والتى تكون مقابلة لبعضها ومتوازية ومتراكبة على بعضها.

(Hydrogen bonds form between peptide groups of polypeptide segments lying adjacent and parallel with one another).

أما المجاميع الجانبية R فأنها توجد جانبيًا أعلى وأسفل السلسلة الرئيسية (شكل ٤١).

يمكن لقطعتين أى جزئين من سلسلة واحدة لعديد الببتيدات أو جزئين من سلسلتين مختلفتين أن يكون نوعين من تركيب بيتا وتتوقف ذلك على التوجيه النسبى للقطعتين. ففى الحالة الأولى أو فى النوع الأول تكون القطعتين متوازيتين أى لهما نفس التوجيه same orientation أى أن الطرف N إلى الطرف C يكون أتجاه نفس القطعتين أو العكس الطرف C إلى الطرف N يكون أتجاه نفس القطعتين (الطرف C يسمى C terminal والطرف N يسمى N terminal). وهذه الحالة يسمى التركيب بيتا متوازى parallel. وفى الحالة الثانية أى النوع الثانى إذا كان الطرف N إلى الطرف C فى قطعة وفى القطعة الأخرى الطرف C إلى الطرف N أى الأتجاه عكسى فيسمى التركيب بيتا غير متوازى anti parallel (شكل ٤١). وعندما تتفاعل سلاسل عديد الببتيدات مع بعضها بالطريقة السابق شرحها فأنه يتكون تركيب معين متموج يسمى السطح المتموج بيتا B-pleated sheet يمكن أن تتجمع هذه الأسطح المتموجة مع بعضها أى تتقارب وتتلامس وتصطف وتتماسك مع بعضها على هيئة مجاميع stacked ويكون التماسك والألتصاق بين هذه الطبقات بواسطة قوى جذب فان درفالس Van der Waals Forces وحيث تصطف هذه الطبقات على هيئة أعمدة طويلة وعادة يوجد هذا التركيب فى أنواع التراكيب الليفية مثل الحرير.





The *β*-pleated sheet

72 Comprehensible biochemistry

شكل ١ : تراكيب بيتا β-structures = رقائق بيتا :Beta sheets

(a) سلسلتين من عديد الببتيدات فى وضع معاكس **antiparallel** ومرتبطتين بروابط إيدروجينية. المجموعة الجانبية **R** توجد بالتبادل أعلى ثم أسفل.

(b) تركيب متوازى **parallel** ومعاكس **antiparallel** لتراكيب بيتا فى جزيء واحد (رقائق بيتا).

(c) عدد كبير من سلاسل عديد الببتيدات المتقاربة **adjacent chains** تكون β- **pleated sheet**.

البروتين الليفى والبروتين الحبيبى:
Fibrous Versus Globular Proteins

قليل من البروتينات حلزون ألفا نقى أو تركيب بيتا نقى. تحتوى البروتينات عادة على كلا النوعين حيث أن مناطق منها تكون حلزون ألفا ومناطق تكون تركيب بيتا أى عادة تكون البروتينات خليط من النوعين. وحيث أن هذه التراكيب ألفا أو بيتا صلبة فإن البروتين الذى يحتوى على سلاسل أغلبها أحد هذين النوعين يكون جزيىء البروتين طويل ورفيع عادة ويسمى بروتين ليفى fibrous protein.

يعتبر البروتين الليفى عادة من البروتينات التركيبية والمسئولة عن تركيب الخلية والأنسجة والكائنات الحية. بعض أمثلة البروتينات التركيبية الكولاجين collagen وهو عبارة عن بروتين الغضاريف والعظام والخيوط التى تصل العضلات بالعظام وبروتين الإيلاستين elastin وهو بروتين الجلد. بعض البروتينات غير قابلة للذوبان فى الماء ومثال ذلك بروتين الشعر والحرير fibroin.

والعكس صحيح فى حالة البروتين الحبيبى حيث أنه يحتوى على التراكيب حلزون ألفا وتراكيب بيتا أى رقائق بيتا β-sheets وهى تكون قصيرة وتتداخل بطريقة مبعثرة فى مناطق أو أجزاء حلزونية عشوائيًا أى مناطق عشوائية الحلزون وتلتحم أو تلتصق هذه الأجزاء بواسطة تفاعلات عديدة بين خيوط السلسلة الواحدة وينتج عن هذه التفاعلات تراكيب مندمجة كروية إلى شبه كروية. عادة يكون البروتين الحبيبى هو البروتين catalytic protein الذى يقوم بعمل التفاعلات catalytic مثل الإنزيمات والبروتين التنظيمى للخلية regulatory تتميز البروتينات بأنها محددة الشكل والتركيب ولكنها قابلة للتغير وفقد شكلها a well defined but deformable structures. أجزاء أو قطع كبيرة من العمود الفقرى لعديد البيتيدات المكونة للبروتين الحبيبى المثالى عبارة عن حلزون ألفا ويلتف وينحنى ويتداخل بدرجة شديدة هذا الجزيىء عادة أجزاء من حلزون ألفا الصلب تتبادل مع أجزاء حلزونية مرنة عشوائية الحلزنة والتى تسمح بإنحناء السلسلة بدون ضغط ميكانيكى زائد.

أجزاء عديدة من السلسلة والتى تكون على أبعاد طويلة نسبيًا أى بعيدة عن العمود الفقرى لسلسلة عديد الببتيدات تكون أجزاء قصيرة متوازية وغير متوازية (معاكسة) من تراكيب بيتا ونتيجة لذلك التراكيب جزئيا مسئول عن طى العمود الفقرى. يسمى كل من حلزون ألفا وتركيب بيتا بالتراكيب الثانوى للبروتين **secondary structures**.

وعندما يحدث إنطواء وطى زائد للعمود الفقرى يسمى التركيب الثالثى للبروتين **tertiary structure** وتسمى سلسلة الأحماض الأمينية الخام بالتركيب الإبتدائى للبروتين **primary structure**. ينشأ التركيب الثانوى نتيجة لتكوين روابط إيدروجينية بين مجاميع الببتيدات بينما ينشأ التركيب الثالثى من حلزون ألفا وتركيب بيتا مع حدوث كثير من التفاعلات الجانبية للسلسلة أو فى السلاسل عديدة الببتيدات. يتوقف التركيب الثالثى للبروتين على وجود خمسة أنواع من التفاعلات أى يتحكم فى حدوث التركيب الثالثى خمسة أنواع من التفاعلات وهى كما يأتى (شكل ٤٢).

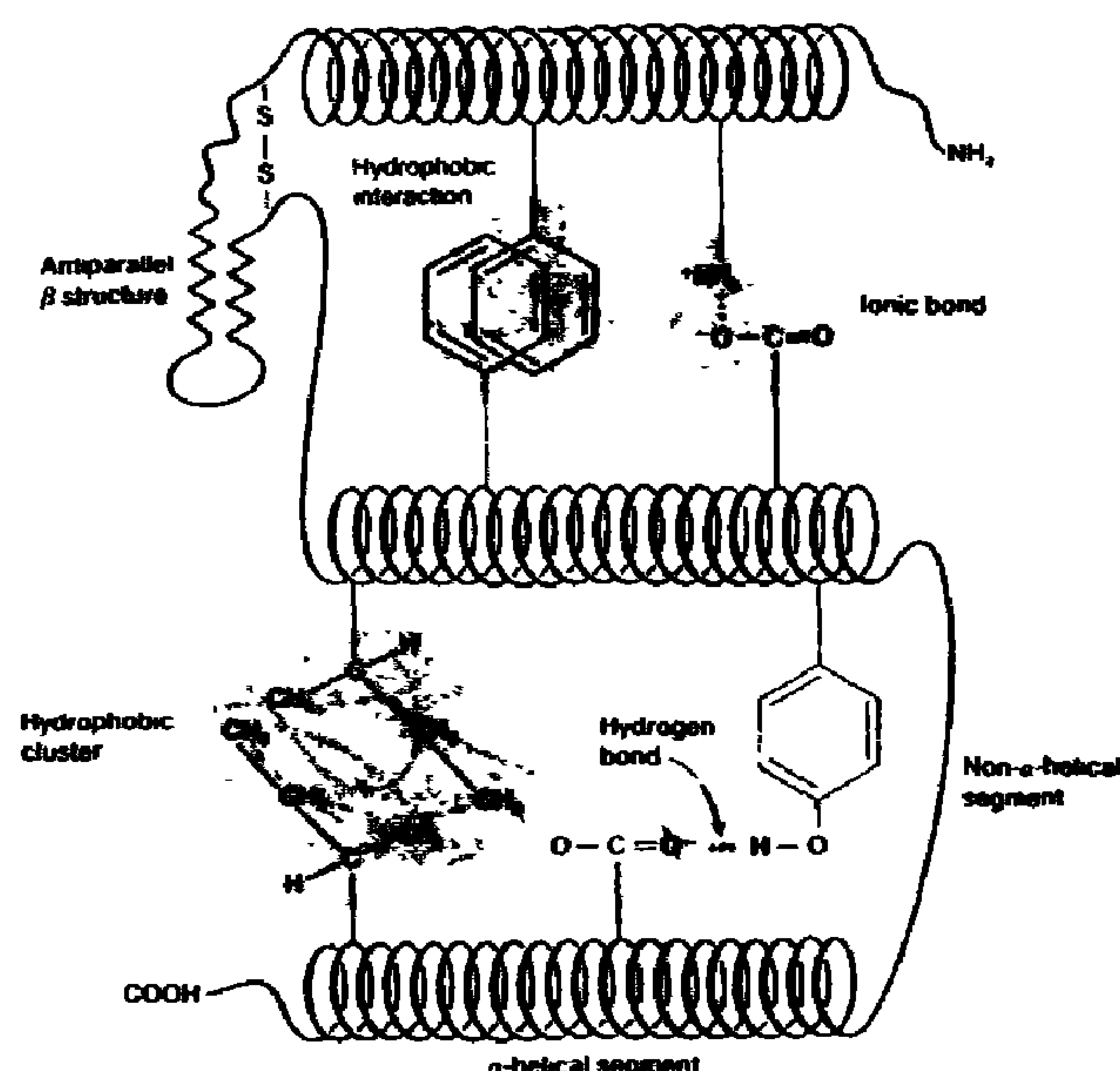
١ – تجمع الأجزاء الكارهة للماء فى مجاميع **hydrophobic clustering** فى أجزاء السلاسل الجانبية المكونة من الأيدروكربونات للأحماض الأمينية فينيل الانين وليوسين وأيزوليوسين وفالين. وتعتبر هذه الحالة من العوامل الهامة بل أهم عامل فى ثبات السلسلة والجزىء.

٢ – روابط أيونية **ionic bonds** بين المجاميع المختلفة الشحنة فى السلسلة الجانبية أى سالب وموجب.

٣ – روابط إيدروجينية **hydrogen bonds** بين مجموعة الإيدروكسيد فى التيروسين ومجموعة الكربوكسيل فى الأسبارتك والجلوتاميك.

٤ – قوى فان درفالس **van der Waals Forces** والتى ينتج عنها تفاعلات معينة بين مجاميع من الأحماض الأمينية والتى قد تكون قريبة من بعضها أو غير قريبة فى سلسلة عديد الببتيدات.

٥ – التعاون بين الأيونات المعدنية لتكوين تراكيب معقدة بين مجاميع الأمينات والإيدروكسيد والكربوكسيل والنيتروجين الموجود فى تركيب حلقى **ring nitrogens** وأزواج مجاميع **SH** أى السلفهيدريل.



شكل ٤٢ : شكل إفتراضي لبروتين حبيبي به تفاعلات عديدة مختلفة للسلسلة الجانبية.

يتضح مما سبق أن هذه العوامل هى التى تحدد شكل جزىء البروتين وعامة يمكن التعليق على ما سبق فيما يأتى:

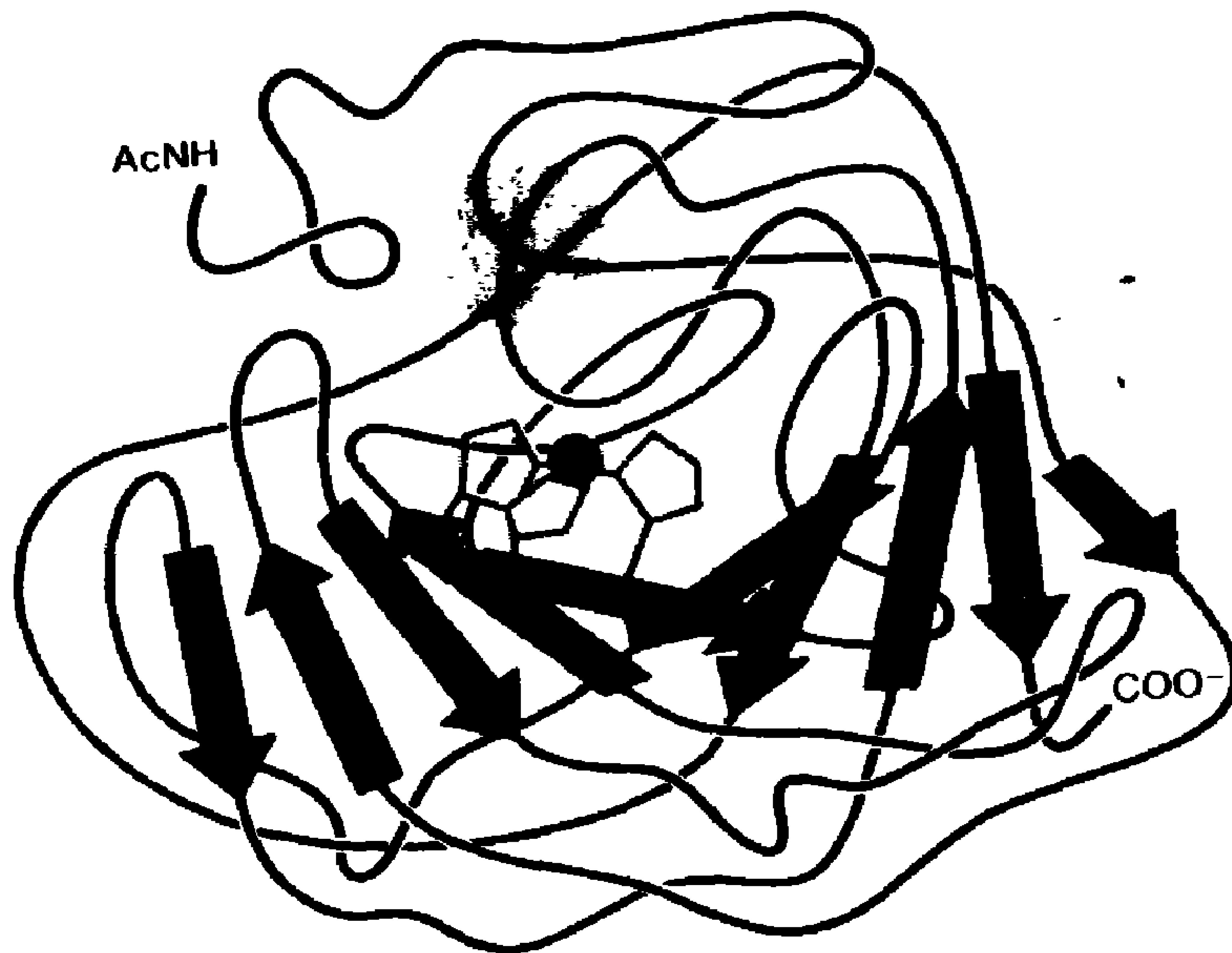
١ - جميع التفاعلات السابقة، عدا التنافر بين الشحنات المتماثلة، يسبب ضم الأحماض الأمينية مع بعضها وحتى المتباعدة عن بعضها.

٢ - تقرب الروابط الإيدروجينية بين الأحماض الأمينية المتباعدة أحيانًا، ولكن عادة تسبب الرابطة الإيدروجينية الواحدة تغير طفيف مناسب فى وضع أى موضع الأحماض الأمينية.

٣ - يسبب كلا من حلزون ألفا وتركيب بيتا وجود أجزاء صلبة وشريطية فى العمود الفقرى لعديد الببتيدات.

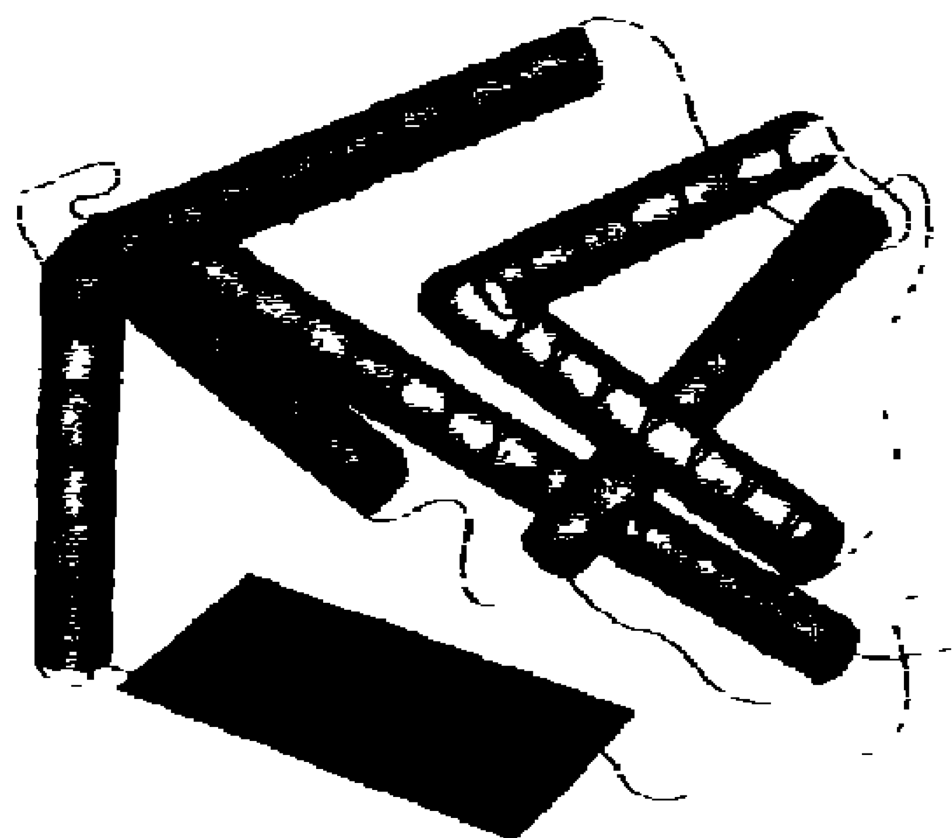
يوضح تركيب إنزيم carbonic anhydrase، وهو إنزيم يتكون بالطبع من البروتين ويمكن توضيح تركيبه من حيث شكل ثلاثى الأبعاد three-dimensional

structure فهو يحتوى على تركيب بيتا ومجموعة من أجزاء كارهة للمـــاء وثلاثـــة أحماض أمينية مرتبطة تعاونيًا أى برابطة تعاونية coordination bond مـــع أيـــون معدنى (شكل ٤٣).



شكل ٤٣ : تركيب ثالثى لإنزيم carbonic anhydrase فى الإنسان. يوضـــح ثلاثـــة جزئيات هستدين مرتبطين مع أيون زنك فى الموقع النشط active site.
خيوط Strands تركيب بيتا والتى تسمى أيضًا رقيقة بيتا beta sheet (الجمع رقائق بيتا β-sheets).
ترسم على هيئة أسهم من مجموعة الأمنيو إلى الأطراف الكربوكسيلية. لاحظ twisting رقائق بيتا. الدائرة عبارة عن تجمعات أى مجاميع cluster من الأجزاء الكارهـــة للمـــاء a hydrophilic cluster.

بالرغم من أن تركيب جزئ البروتين ثلاثى الأبعاد قد تم إكتشافه منذ ما يزيد على ثلاثون عامًا إلا أن التعرف على التركيب الدقيق لجزيىء البروتين لم يتم معرفتـــه إلا حديثًا حيث أن العمل فى ذلك كان بطئ وصعب ومتعب ودقيق. حديثًا تم التعرف على ما يزيد عن ٣٠٠ بروتين. وقد إتضح أن حلزون ألفا وتركيب بيتا فى البروتين مرتبة فى مجاميع تباديل بسيطة simple combinations (شكل ٤٤) وذلك بترتيب وأنظمـــة هندسية معينة geometry تسمى هذه الترتيبات والأنظمة الهندســية المعينـــة بإســـم motifs وهى موجودة فى كثير من البروتينات. ولذا يمكن وصف جزئ البروتين الآن على أنه يتكون من مجموعة من موتفس a aet of motifs.



شكل ٤٤ : تقوية جزئ البروتين بواسطة α-helix ورقائق بيتا.

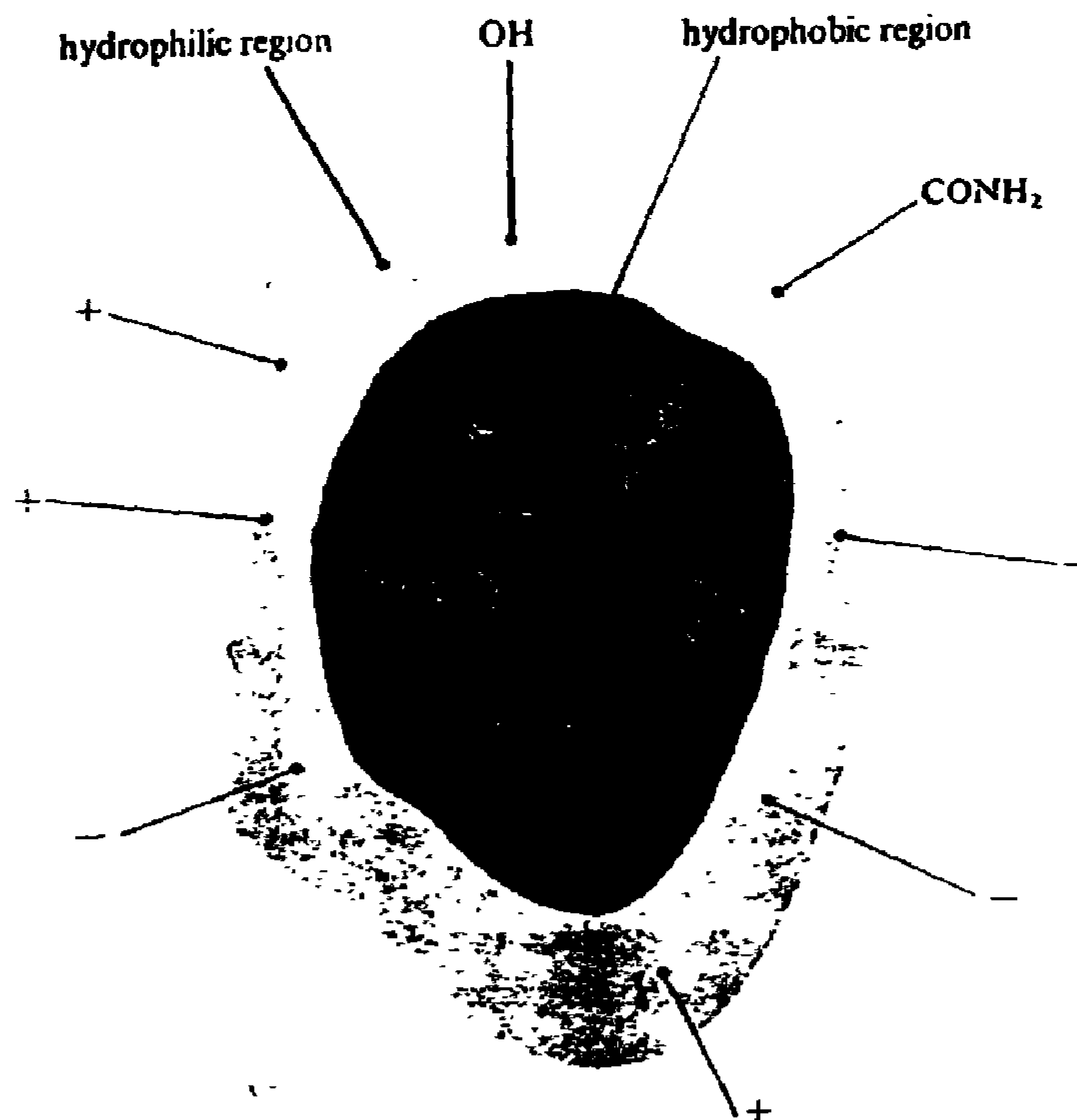
بعض الموتفس motifs متخصصة لأداء وظائف معينة مثل التفاعل مـــع بعـــض الجزيئات الغير بروتينية مثل مرافقات الإنزيمات أو الأحماض النووية. بينما وظائف أخرى للموتفس وهى أنها توجد كجزء من تجمعات لجزيئات كبيـــرة. طـــى بعـــض الموتفس الخاصة يحتاج إلى تتابع خاص معين من الأحماض الأمينية وهى فى حالة التركيب الإبتدائى primary structure ولذلك فإن وجود أحد أو واحد من هذا التتابع المعين للأحماض الأمينية فى البروتين يمكن أن يكون دليل هـــام وكشـــاف لوظيفـــة البروتين.

البروتينات ذات تحت الوحدات:

Proteins with Subynits

تلتوى سلسلة عديد الببتيدات بحيث أن الجانب الغير قطبى non-polar side يكون لداخل أى بعيد عن الإرتباط بالماء (شكل ٤٥) ولكن من النادر أن يحدث ذلك. تكـــون الأحماض الأمينية الغير قطبية الموجودة عن السطح مجايع لتقليل سطح التلامس مع الماء. وفى حالة سلسلة عديد الببتيدات التى لها منطقة كبيرة من المجاميع الكارهـــة للماء يمكن أن تقلل من تلامسها مع الماء بالتزاوج أو بالإزدواج pairing من منطقة أخرى بها مجاميع كارهة للماء لجزيء آخر من عديد الببتيدات. ولذلك فإذا إحتـــوى جزيىء عديد الببتيدات على مناطق كارهة للماء متباعدة وفى وجود جزيئات أخـــرى من عديد الببتيدات مشابهة لهذا الجزيىء قريبة منه إن هذه المجاميع الكراهة للمـــاء تتجمع مع بعضها بين الجزيئات المختلفة مسببة تقليل مساحة السطح المعرض للماء وفى هذه الحالة يسمى البروتين أنه يتكون من تحـــت وحـــدات متماثلـــة identical subunits. وهذه الحالة من تحت الوحدات المتماثلة تحدث عندما يكون عـــدد تحـــت الوحدات الشائع قليل نسبيًا أثنين أو ثلاثة أو أربعـــة أو ســـتة ولكـــن يوجـــد حالـــة بروتينات عديدة تحت الوحدات multisubunit system وتتميز هذه الحالات بأن لهـــا مميزات فريدة وهى أن هذه الأنواع من البروتين يمكن بســـهولة وبكفـــاءة عاليـــة وبسرعة تقوم بنشاط معين أو بعمل معين أو بتفاعل معين أو بوظيفة معينة كما أنها بسرعة تتوقف عن هذا العمل أو التفاعل أو الوظيفة ثم تعاود ذلك مرة أخرى وهكذا يمكن أن يحدث تتابع من توقف وعمل وهكـــذا يتكـــرر بإســـتمرار efficiently and rapidly switched on and off. ولكن كيف يحدث ذلك؟ يحدث ذلك نتيجة لما يسمى بالتأثيرات المختلفة التجسيم allosteric effects. يمكن أيضًـــا أن يكـــون البـــروتين متكون من عديد تحت الوحدات المتماثلة identical sub units أو من عديـــد تحـــت الوحدات الغير متماثلة non-identical sub units. يحـــدث الأخيـــر نتيجـــة لتجميـــع جزيئات مختلفة من عديد الببتيدات. ومثال لذلك إنـــزيم RNA polymerase والـــذى يقوم ببناء RNA فإنه يتكون من خمسة تحت وحدات وجد أن أربعة منها مختلفـــة.

وتركيب البروتين المكون من تحت وحدات يسمى عادة التركيب الرباعى quaternary structure.



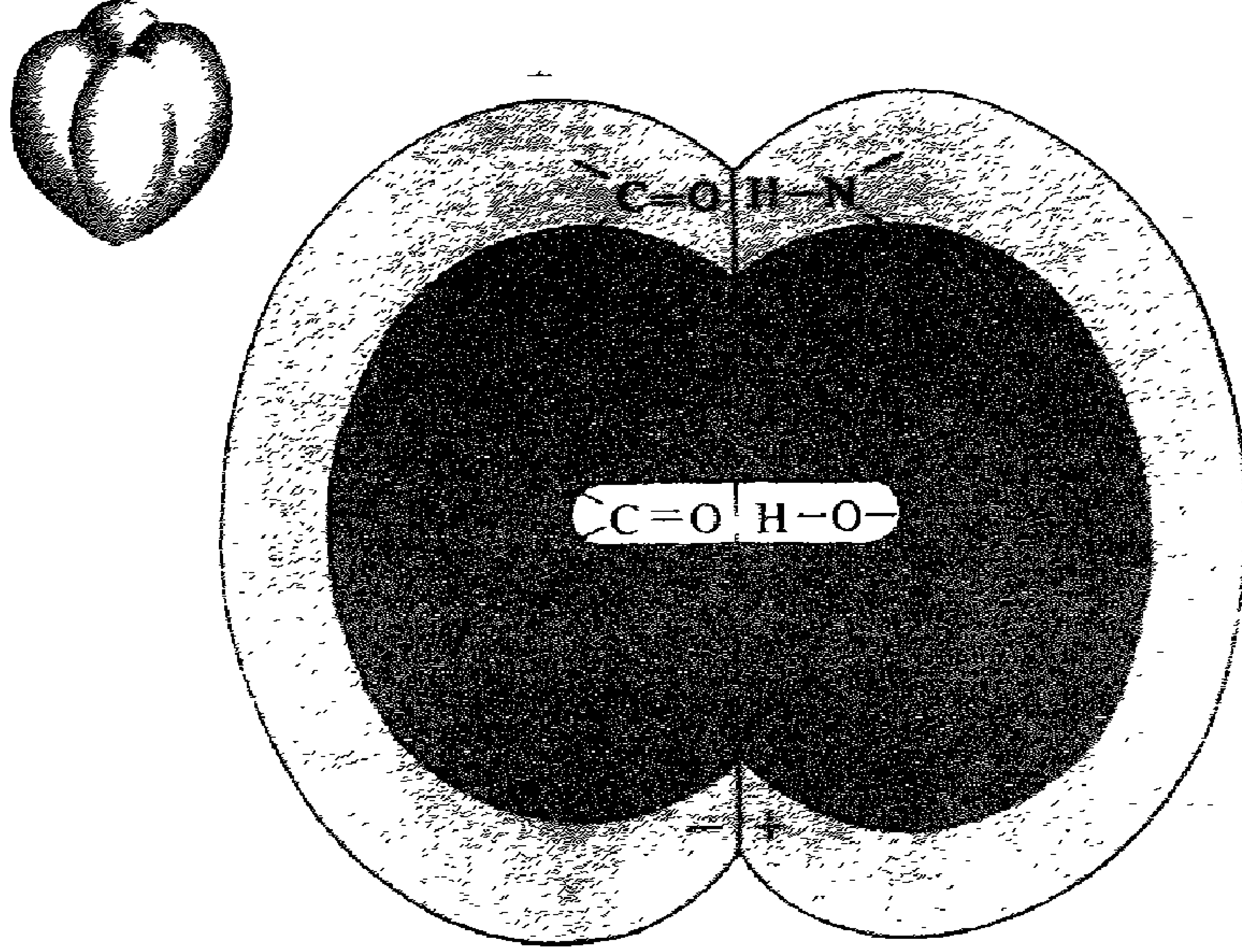
شكل ٤٥: تركيب جزيء بروتين مثالى يوضح تكوينه لجزئين أحدهما داخلى كاره للماء hydrophobic، والآخر خارجى محب للماء hydrophilic.

التركيبة الرباعي للبروتين:

Quaternary Structures of Protein:

سبق الحديث وتعريف التركيب الرباعى للبروتين فقد يكون عدد تحت الوحدات أربعة tetrameric structure كما فى الهيموجلوبين (شكل ٤٦). يوجد فى الشكل جزيء بروتين رباعى تحت الوحدات يوضح طريق إتصال والتفاعل بين تحت وحدتين two monomers (شكل ٤٦). ومثلاً فى حالة إنزيم asparate

transcarbamylase فإنه يتكون من عديد من تحت الوحدات polymeric وهـــى ١٢ تحت وحدة (شكل ٤٧). توجد بعض الروابط شائعة لعمل إرتباط بين شرائط الببتيدات المتقاربة لتكوين التركيب الرباعى للبروتين (شكل ٤٨).



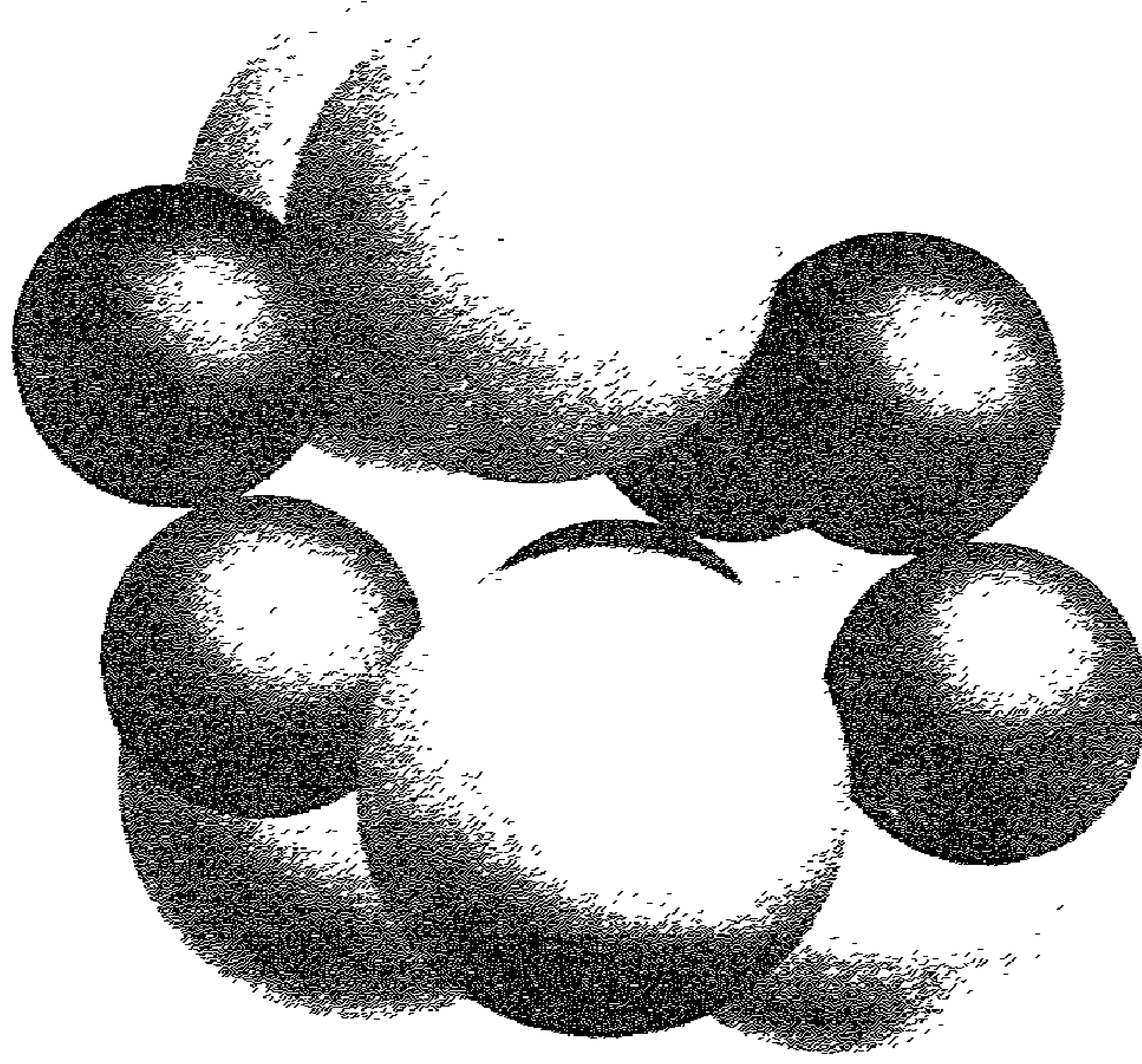
شكل ٤٦: على اليمين جزئ الهيموجلوبين رباعى الوحدات tetrameric. على الشـــمال جزيء بروتين أيضًا رباعى تحت الوحدات tetrameric. فى الوسط قطاع فى تحـــت وحـــدتين يوضح طريقة الإتصال بينهما على السطح الفاصل بينهما. الجزء الداخلى كاره للمـــاء (غـــامق) والجزء الخارجى (فاتح) محب للماء.

التأثيرات المختلفة التجسيم:

Allosteric effects:

وهى إختلاف تحت الوحدات فى أداء وظيفتها فنجد فى حالـــة إنـــزيم aspartate transcarbamylase توجد ٦ وحدات صغيرة الحجم (غامقة اللون) وهى عبارة عـــن تحت وحدات تنظيمية regulatory subunits وستة وحدات كبيـــرة الحجـــم (فاتحـــة اللون) وهى عبارة عن تحت وحدات وظيفية مؤديـــة للوظيفـــة catalytic subunits

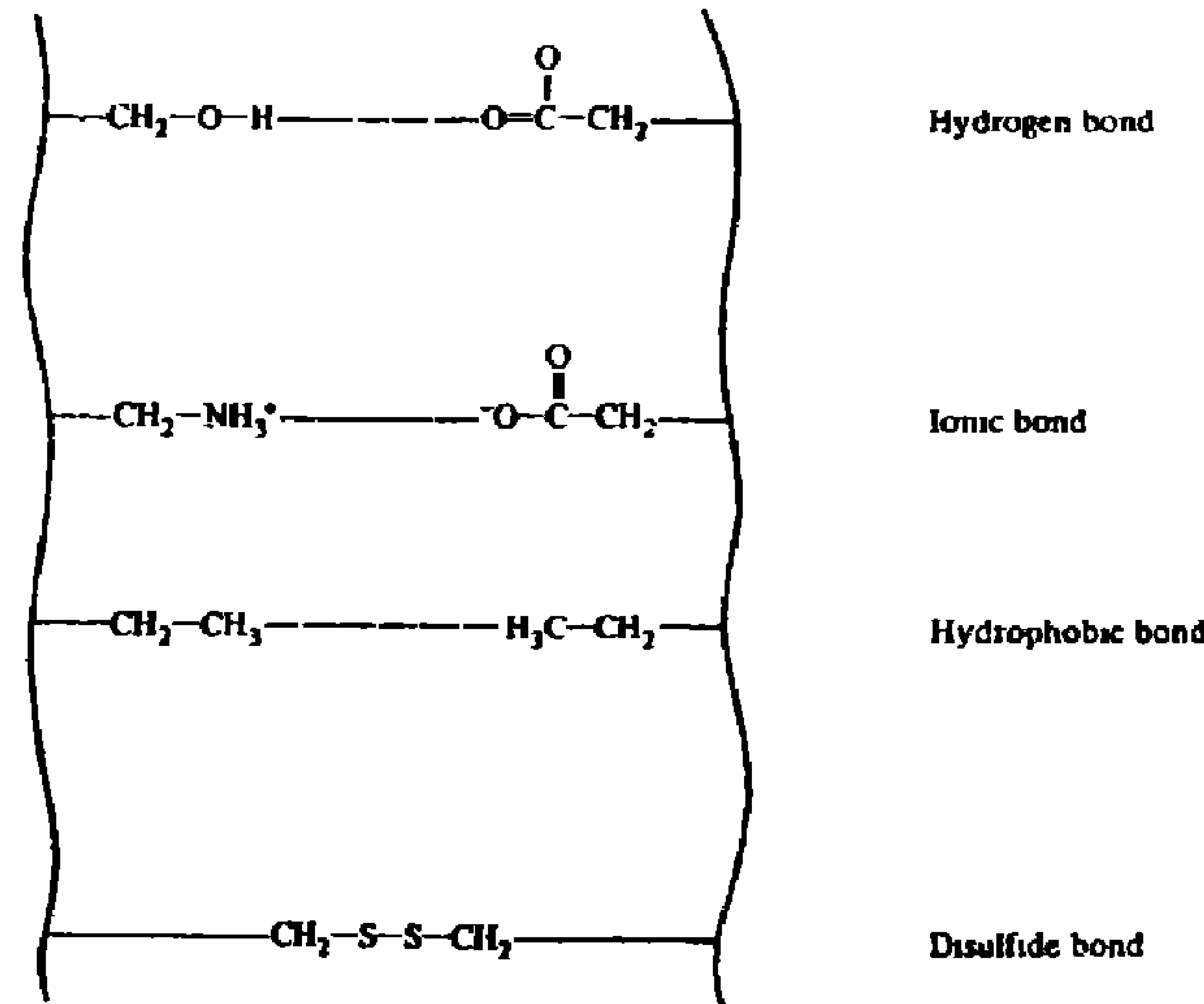
(شكل ٤٧). الإنزيم السابق عبارة عـن allosterically controlled enzyme موقـع allosteric site هو عبارة عن موقع إرتباط على سطح الإنزيم.



شكل ٤٧ : تحت وحدات إنزيم aspartate transcarbamylase تحـت الوحـدات الصغيرة الغامقة regulatory subunits وتحت الوحـدات الكـبيرة الفاتحـة catalytic subunits هذا الإنزيم allosterically controlled enzyme.

وهو يختلف تمامًا عن الموقع النشط أو الفعـال active site. فـى حالـة إنـزيم allosteric فإن إلتحام جزيىء منظم قeegulatory molecule مع الموقع allosteric يغير تمامًا من شكل الإنزيم وذلك بمساعدته على الإلتحام بمادة التفاعل فى الموقـع النشط أو يمنع الإنزيم من الإلتحام بمادة التفاعـل. تبعًـا لأبحـاث Monod, Jacob,

Changeux وجد أن كثير من بروتينات الإنزيمات لها مواقع sites خـلاف المواقـع النشطة active sites أى catalytic sites أى active catalytic sites ترتبط مع هـذه المواقع جزيئات معينة صغيرة small metabalite molecules وتسمى هذه المواقـع allosteric sites. ونتيجة لهذا الإرتباط الأخير فإنها تؤثر على تفـاعلات أو تفاعـل الإنزيم. وهذه الجزيئات الصغيرة التى تؤثر على تفاعلات الإنزيم وحركياته kinetics تسمى effectors. هذه effectors التى تزيد من سـرعة التفاعـل تسـمى positive effectors أى effectors موجبة والتى تقلل من سـرعة التفاعـل تسـمى negative effectors أى effectors سالبة. يعتقد أن الإلتحام بين effector وموقـع allosteric يغير من شكل وتركيب conformation البروتين وهكذا يؤثر ذلك على تفاعل الإنزيم بين الموقع النشط ومادة التفاعل أو cofactor.



شكل ٤٨: حالات وأنواع مختلفة للروابط التى يمكن ان تحدث بين شرائط الببتيـدات المتقاربة والتى عن طريقها يتم تكوين التركيب الرباعى للبروتين.

عوامل النسخ وأصبع الزنك والبروتينات المرتبطة بدنا:
Transcription factors and Zinc finger

أصبع الزنك عبارة عن بروتين خاص يلـتحم بـدنا وخاصـة بعوامـل النسـخ

transcription factors (عوامل النسخ عبارة عن أى مجموعة من البروتينات تكون قادرة على التأثير على درجة إرتباط إنزيمات بلمرة رنــا RNA polymaerases مــع جزيىء دنا أثناء عملية النسخ. يكون التأثير على درجة الإرتباط بالنقص أو الزيــادة أى يزيد من الإرتباط أو يقلل من الإرتباط. عوامل النسخ لها القدرة علــى الإرتبــاط بجزئ دنا). (تحتوى عوامل النسخ على finger domains والتى توجــد عــادة فــى تتابعات مكررة تسمى بالعقد عديدة الأصــابع multifinger loops domain) domain عبارة عن وحدة وظيفية من بروتين ثالثى tertiary structure. تتكون من سلاســل من أحماض أمينية منطوية لتكوين حلزونات ألفا α helices a ورقــائق بيتــا beta sheets لتكوين بروتين حبيبى globular protein. الــدومينات المختلفــة domains تلتحم ببعضها بواسطة سلاسل مستقيمة نسبيًا من عديــد الببتيــدات لتكــون جــزئ البروتين. هذه الدومينات تسمح بدرجة معينة من الحركة فــى تركيــب البــروتين. (finger domain عبارة تركيب أسبعة الشكل يتكون فى البروتين عندما تتحد سلاسل من الأحماض الأمينية مع ذرة معدن).

أصبع الزنك يتكون من سلسلة مطوية من الأحماض الأمينية على هيئــة أصــبع (صابع) وفى قاعدة هذا الأصبع يوجد جزيئين من السستين وجزيئين من الهســتدين. وهذه الجزيئات الأربعة الأخيرة تلتحم مع أيون زنك مفرد single zinc ion فى ترتيب أو نظام رباعى الأوجه tetrahedral array. يتفاعل الأصبع الواحد مع حوالى أزواج من القواعد فى جزيىء الحامض النووى. أصبع الزننك يرتبط مع دنا ويمكن أن يتواد مع البروتينات التى ترتبط مع رنا مثل RNA-directed RNA polymerase.

تحتوى DNA-binding proteins على أصبع الزنك وسوستة وأبــزيم الليوســين leucine zipper (وهذا الأخير يمكن أن يوجد أيضًا فى بروتينات أخــرى). سوســتة وأبزيم الليوسين يتكون من بروتين به مجموعة من أربعة أو خمسة جزيئات ليوسين تكون مكررة كمجموعة بإستمرار بعد كل سبعة أحماض أمينية فى التركيب الإبتدائى للبروتين. فى حالة التركيب الحلزونى لدنا فإنها تكون صف أو خط أو سلســلة مــن

الليوسين على أحد جانبى الحلزون. ومع وجود حلزونين من هذا النـــوع مـــواجهين لبعضهما two such helixes alongside each other فإن صفين الليوسين يمكـــن أن يتداخلا interdigitate مثل أبزيم السوستة وهذا التركيب يكون وصـــلة ثابتـــة بـــين الحلزونين.

تحتوى DNA-binding proteins أيضًا بروتينات helix-turn-helix (helix-loop-helix) حلزون عقدة حلزون، وهى تتكون.من إثنين من حلـــزون ألفـــا two alpha-helices متصلين ببعضهما بواسطة جزء قصير غير حلزونى يسمى turn. أحد هذين الحلزونين يتعرف على تتابع خاص من النيوكليوتيدات فى جزيىء دنا ويوجد فى شق groove فى جزيىء دنا ثنائى الحلزون، بينما الحلزون الآخر يحفظ ثبـــات وإرتبـــاط حلزونى دنا.

البروتينات المرتبطة بدنا DNA-binding proteins وهى بروتينات قـــادرة علـــى الإلتصاق مع دنا فى بدائيات النواة وحقيقيات النواة وهى تعمل كمنشطات activators أو مثبطات أو كابحات repressors عند تعبير الجين عن وظيفتـــه gene expression وذلك بالتحكم فى إلتحام إنزيم بلمرة رنا مع دنا أثناء عملية النسخ وعلاوة على ذلك فإن هذه البروتينات لهتا دور فى تضاعف أى تكرارية دنا وذلـــك بـــأن تلـــتحم مـــع النيوكليوتيدات فى شريط أو خيط أو حلزون مفـــرد لـــدنا والـــذى يســـتخدم كأصـــل tempelate ويكون غير ملتوى أى غير ملفوف unwound وبذلك تساعد على ثباتها على هذا الشكل وتمنعها من الإلتواء مرة أخـــرى. والهســـتونات لا تـــدخل ضـــمن مجموعة هذه البروتينات. وهكذا فإن البروتينات المرتبة بدنا تتكون من إصبع الزنك وسوستة وأبزيم الليوسين وحلزون عقدة حلزون. تعتبر عوامل النسخ من البروتينات المرتبطة بدنا.

البروتينات المرتبطة بدنا DNA-binding proteins وهى بروتينات قـــادرة علـــى الإلتصاق مع دنا فى بدائيات النواة وحقيقيات النواة وهى تعمل كمنشطات activators أو مثبطات أو كابحات repressors عند تعبير الجين عن وظيفتـــه gene expression

وذلك بالتحكم فى إلتحام إنزيم بلمرة رنا مع دما أثناء عملية النسخ. وعلاوة على ذلك فإن هذه البروتينات لها دور فى تضاعف أى تكرارية دنا وذلك بأن تلتحم مع النيوكليوتيدات فى شريط أو خيط أو حلزون مفرد لدنا والذى يستخدم كأصل tempelate ويكون غير ملتوى أى غير ملفوف unwound وبذلك تساعد على ثباتها على هذا الشكل وتمنعها من الإلتواء مرة أخرى. والهستونات لا تدخل ضمن مجموعة هذه البروتينات. وهكذا فإن البروتينات المرتبطة بدنا تتكون من إصبع الزنك وسوستة وأبزيم الليوسين وحلزون عقدة حلزون. تعتبر عوامل النسخ من البروتينات المرتبطة بدنا.

الإنزيمات:

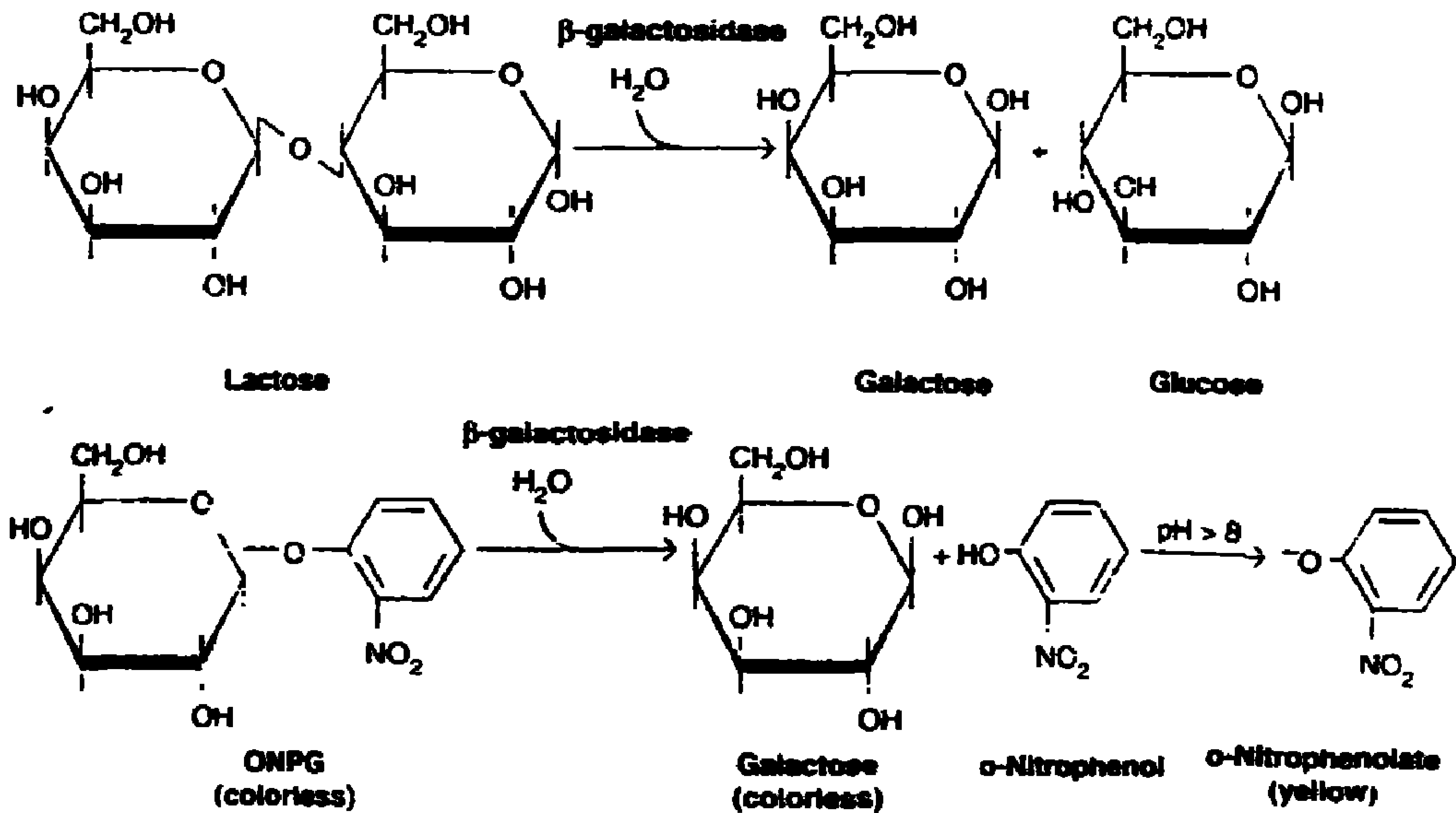
Enzymes

تعتبر الإنزيمات هى عبارة عن عوامل مساعدة بيولوجية biological catalysts. قدرة الإنزيمات فى هذا الصدد تفوق جميع العوامل المساعدة الصناعية أى الكيماوية man-made catalysts. يزيد الإنزيم سرعة التفاعل من $١٠^{٨}$ إلى $١٠^{١٠}$ وبعض الإنزيمات تزيد سرعة التفاعل $١٠^{١٥}$ مرة. الإنزيمات متخصصة جداً أى شديدة التخصص فى عملها حيث أن الإنزيم الواحد يتخصص فى عمل تفاعل معين واحد عادة، وأحياناً مجموعة من التفاعلات المتقاربة، ولذلك توجد إنزيمات كثيرة.

تعبر عن الإنزيمات الجينات أى أن الجين الواحد أو أكثر متخصص فى تخليق إنزيم معين ولذلك يلزم جين أو أكثر معين لتخليق إنزيم معين (أبحاث Tatum, Beadle فى الخمسينيات وأوائل الستينيات على فطر *Neurospora*). وهكذا فإن قياس نشاط الإنزيم يعبر بطريقة جيدة عن وجود الجين الخاص به gene expression. توجد طرق عديدة لدراسة التفاعلات الإنزيمية ومنها طريقتين شائعتين وهى قياس اللون optical assays بإستخدام أجهزة spectrophotometers وقياس درجة الإشعاع radioactivity assays. فى إختبارات قياس اللون للإنزيم أساسها مدى قدرة الإنزيم على إمتصاص الضوء عند طول موجة معين ومن أمثلة ذلك إنزيم بيتا جالاكتوز

سيديز β-galactosidase والذى يقوم بتحليل سكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز، طبيعة التفاعل موضوحة فى الشكل (شكل ٤٩) والرابطة التى يكسرها الإنزيم موضحة فى الرسم.

وللكشف والتعرف على هذا التفاعل وكسر الرابطة فإن مادة التفاعل هى مادة كيماوية تركيبية o-nitrophenyl galactoside وإختصارها ONPG. هذا المركب يشابه سكر اللاكتوز فى أنه له نفس الرابطة ولذلك فإن الإنزيم يعمل على هذه الرابطة ويحلل ONPG. الميزة فى هذا التفاعل أن هذا المركب عديم اللون وعند تحلله يعطى سكر جالاكتوز و o-nitrophenol والمركب الأخير يتحول فى pH أعلى من ٨ إلى o-nitrophenolate والذى يكون لونه أصفر غامق (شكل ٤٩)، وهكذا فإن نشاط الإنزيم يمكن التعرف عليه بتقدير تركيز أورثونيتروفينوليبت عند طول موجة ٤٢٠ نانومتر بدرجة تركيز اللون الأصفر بجهاز spectrophotometer.



شكل ٤٩ : الشكل العام العلوى يوضح نشاط الإنزيم. والشكل السفلى يوضح نشاط الإنزيم β-galactosidase على ONPG وتكوين اللون الأصفر ليسهل الكف عن نشاطه بواسطة جهاز spectrophotometer عادى.

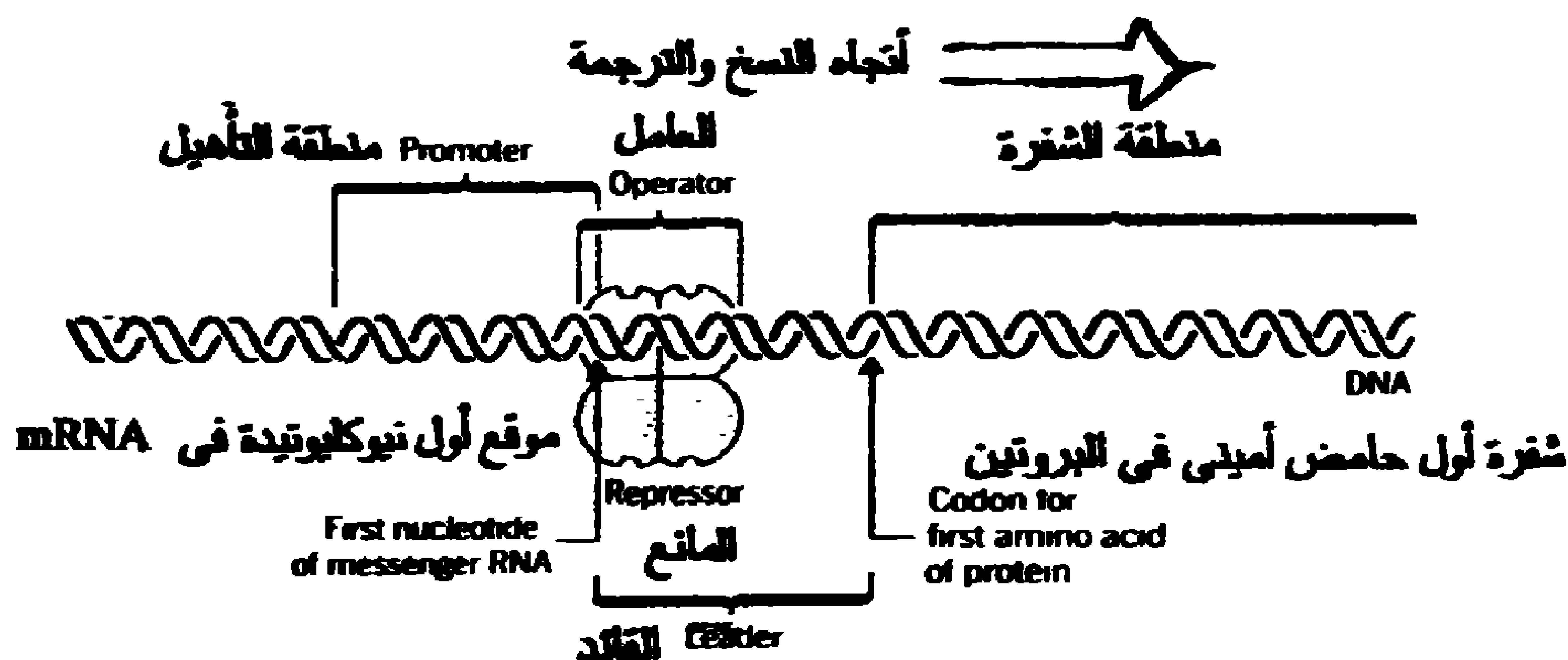
فى حالة إختبارات تقدير تركيز الإشعاع فإن مادة التفاعل المشعة تضاف لمخلوط التفاعل ويمكن قياس تركيز الإشعاع فى ناتج التفاعل أو قياس درجة فقد الإشعاع فى بيئة التفاعل. توجد طرق عديدة لعمل هذه الإختبارات. وأحد أسس هذه الإختبارات بالنسبة للبروتينات ودنا ورنا يكون قياس درجة البلمرة والأحماض النووية وأن جميع البروتينات والأحماض النووية غير قابلة للذوبان فى ١ جزيئى من ترای كلورو حامض الخليك trichloracetic acid (TCA) بينما الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات تذوب فى TCA. ومثال لذلك لقياس درجة تخليق البروتين فإنه يستخدم أحماض أمينية عددها عشرون حامض أحدها مّعلم أى بواسطة الكربون المشع ك١٤ مع وجود إنزيمات مناسبة وعوامل منشطة factors لازم للتفاعل. وبعد مدة مناسبة من التفاعل يضاف TCA ثم يتم ترشيح المخلوط وغسيله بواسطة TCA. الحامض الأمينى المشع يذوب فى TCA ويمر عبر ورقة الترشيح ويوجد فى الراشح ولكن البروتين يحجز على ورقة الترشيح. يمكن قياس درجة الإشعاع على ورقة الترشيح ومنها يستدل على تركيز البروتين ومعدل تخليقه نتيجة التفاعل. أى يستدل على سعرة التفاعل بدرجة الإشعاع.

إستخدام إنزيم اللاكتيز (بيتا جالاكتوسيديز) فى الهندسة الوراثية:

لكى يتمكن مهندس الوراثة genetic engineer من تنظيم عملية إنتاج RNA يجب أن يتحكم فى كيفية البدء والانتهاء فى عملية الإنتاج حيث أنه إذا لم يمكنه كيف ومن أين يبتدأ فستكون عملية إنتاج RNA مختلة وأيضاً إذا لم يمكنه كيف ومتى ينتهى من العملية فسيحدث إختلال فى إنتاج RNA. يمكن التحكم فى ذلك بواسطة طريقتين وهما المنع أو التثبيط repression والتوهين attenuation وقد تم دراسة هاتين الطريقتين بالتفصيل فى البكتيريا. وفيما يلى دراسة الحالة الأولى.

دراسة تحكم الجين فى الصفة عن طريقة إستخدام الموانع أو المثبطات

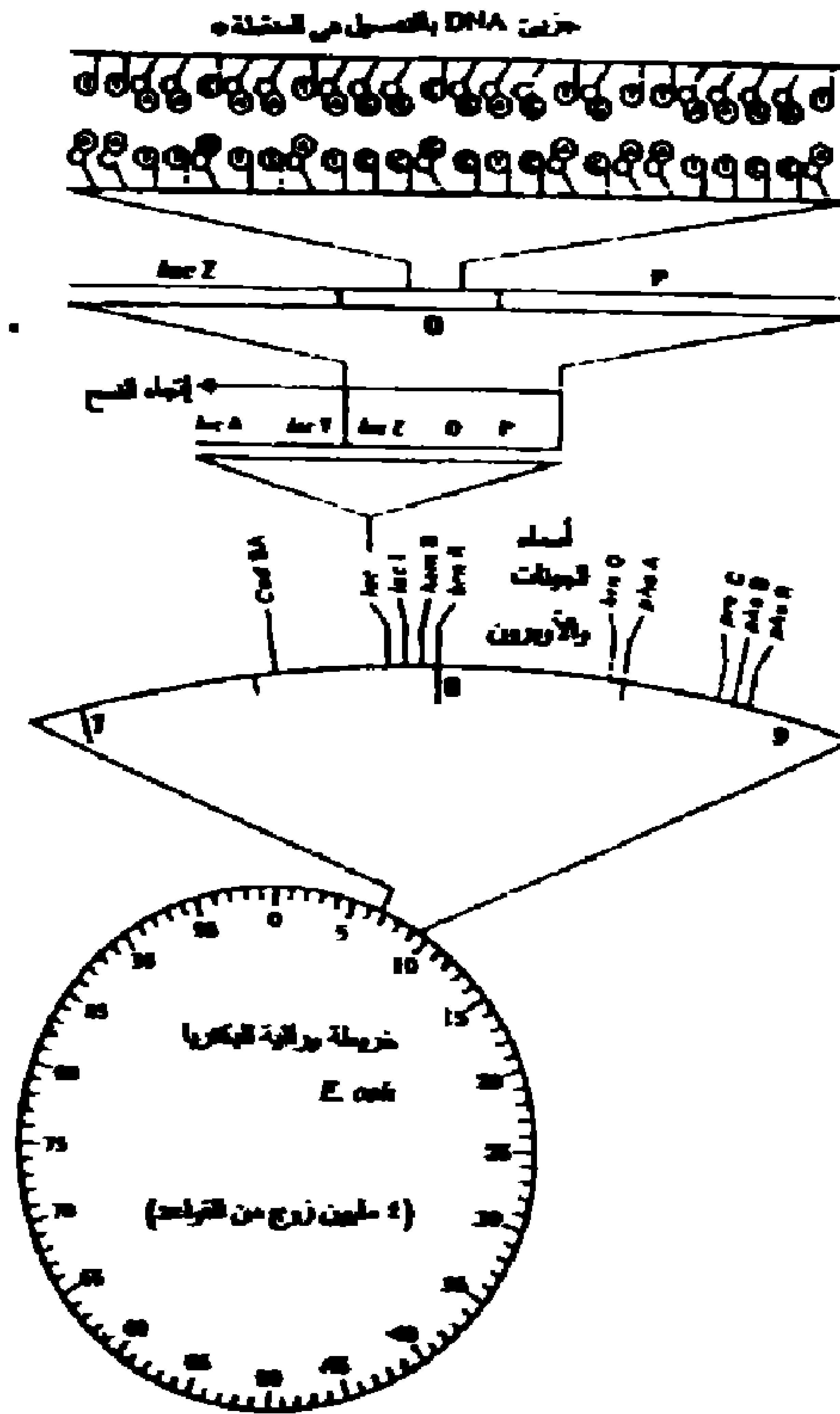
repressors أجريت على بعض الحالات ولكنها درست بكثرة فـي حالـة الإنزيمـات المحللة للمركبات الغذائية التى تتكون داخل الخلية البكتيرية. تتميز هـذه الإنزيمـات المدروسة بأنها لا تنتج داخل الخلية البكتيرية إلا فى حالة وجود المركـب الغـذائى الذى تحلله substrate فى داخل الخلية البكتيرية. بمعنى أنه فى حالة عـدم وجـود المركب داخل الخلية البكتيرية لا يتكون الإنزيم. ومثـال ذلـك إنـزيم لاكتيـز داخـل البكتيريا *E. coli*. وقد وجد أن الجين أو الجينات التى تتحكم فى الإنزيم تتوقف عـن عملها وبالتالى لا ينتج الإنزيم فى حالة وجود نوع معين متخصص مـن البـروتين يسمى المانع repressor والذى يرتبط بحـلزونى DNA فى منطقة ملاصقة لبـداية المنطقة الخاصة بالجين وبالتالى يمنع الجين من إظهار تأثيره. حيث أن وجود المانع يمنع إنزيم RNA polymerase من إداء عمله وبالتالى لا تتكون رسالة من الجين أى لا يتـكون mRNA خاصة بهذا الجين والعكس صحيح عند توفـر سـكر اللاكتـوز داخل الخلية البكتيرية فإن المانع يترك مكانه على الجين ويلتصـق بالسـكر ولـذلك يصبح الجين قادر على عمل رسالة message ويصبح إنزيم RNA polymerase قادر على العمل فى منطقة الجين ودائماً يرتبط الإنيزم بالـ DNA فى منطقة قريبـة مـن الجين تسمى منطقة التأهيل promoter. يتحرك الإنزيم من منطقة التأهيل إلى منطقة الجين ويتكون فى هذه المنطقة mRNA قصـير يسـمى القائـد leaser أى leader mRNA ثم يلى ذلك تكوين mRNA الخاص بمنطقة الجين والمكون لشفرات الجـين ثم يلتصق mRNA بالريبوسومات لتكوين البروتين المكون لإنـزيم اللاكتيز نتيجـة لتكوين الإنزيم يتم تحليل سكر اللاكتو. بعدد تمام تحليل سكر اللاكتوز لا يجد المـانع السكر ليلتصق به فينتقل ويرتبط مرة أخرى بالجين فـى منطقـة تسـمى العامـل operator وبذلك يمنع الجين من أظهار تأثيره (شكل ٥٠) أى أنه يمنع تكون الرسالة الخاصة بتكوين إنزيم اللاكتيز وبمعنى آخر يمنع تكـوين mRNA الخـاص بـإنزيم اللاكتيز.



شكل ٥٠: التحكم فى إبراز صفة الجين بواسطة gene expression repressor.

ومما هو جدير بالذكر أن لكل جين مانع خاص به وأيضاً منطقة تأهيل خاصة به. ولهذا النظام فائدة عظمى للخلية حيث أنه يوفر للطاقة اللازمة لإنتاج الإنزيمات فى عدم وجود مادة التفاعل substrate وحيث يكون إنتاج الإنزيمات غير مفيدة للخلية. هذه الإنزيمات التى تتميز بأنها تتكون فقط فى وجود التفاعل تسمى بالإنزيمات التأقلمية adaptive enzymes ويوجد منها الكثير فى الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات والميكوبلازما. أحياناً تمنع مجموعة من الجينات قريبة من بعضها من إظهار تأثيرها بواسطة مانع واحد فقط فتسمى هذه المجموعة من الجينات أوبيرون operon. ومن أحسن الأمثلة لذلك حالة سكر اللاكتوز فى خلية البكتيريا حيث أنه يوجد ٣ جينات متقاربة هى التى تتحكم فى التحول الغذائى لسكر اللاكتوز وتخليق إنزيم اللاكتيز ويسمى الـ operon فى هذه الحالة بإسم lac. والجينات الثلاثة هى lac Z، lac Y، lac A متراصة بجانب بعضها على الكروموسوم البكتيرى بالقرب من الموقع ٨ للخريطة الكروموسومية near map position 8. يبدأ عمل إنزيم RNA polymerase من المكان P ويتجه ويستمر فى عمله حتى نهاية الجين lac A. أى أن الإنزيم يتوقف عمله تماماً بعد إتمام مروره على الجين lac A. وعندما يرتبط مانع أوبيرون lac فى منطقة الجين lac 1 مع lac operator وهو المنطقة O فإن عملية

نسخ mRNA تتوقف تماماً بالنسبة لهذه الثلاث جينات. ومما هو جـدير بالـذكر أن تتابع الـ nucleotides فى هذه المنطقة من الكروموسوم البكتيرى معروف تماماً كما أن تتابع nucleotides لهذا المانع معروف كما هو فى الشكل (شكل ٥١).



شكل ٥١ : operons على الكروموسوم البكتيرى للبكتيريـا E. coli. الكروموسـوم البكتيرى أى DNA يكون حلقي ويقسم إلى ١٠٠ وحدة. تكبير جزء مـن DNA عنـد الوحدة رقم ٨ يوضح مكان lac operon. ويوجد جينات lac Z و lac y و lac A تتحكم فى تخليق سكر اللاكتوز. يتم نسخ هذه الثلاث جينات فى mRNA واحد.

P أى promoter وهى المنطقة التى فيها إنزيم RNA polymerase يرتبط بجزيء DNA أما عن O أى operator وهى المنطقة التى فيها يرتبط repressor بالجزيء. Lac Z هـى عبارة عن جين مسئول عن تكوين الإنزيم الذى يحلل اللاكتوز. ترتيب النيوكلوتيـدات فى DNA فى الجين الخاص بإنزيم اللاكتيز معروف تماماً. أعلى الرسم جزيء تفصيلى لمنطقة O على الكروموسوم البكتيرى.

الباب الثالث

تضاعف DNA

تضاعف DNA

DNA Replication

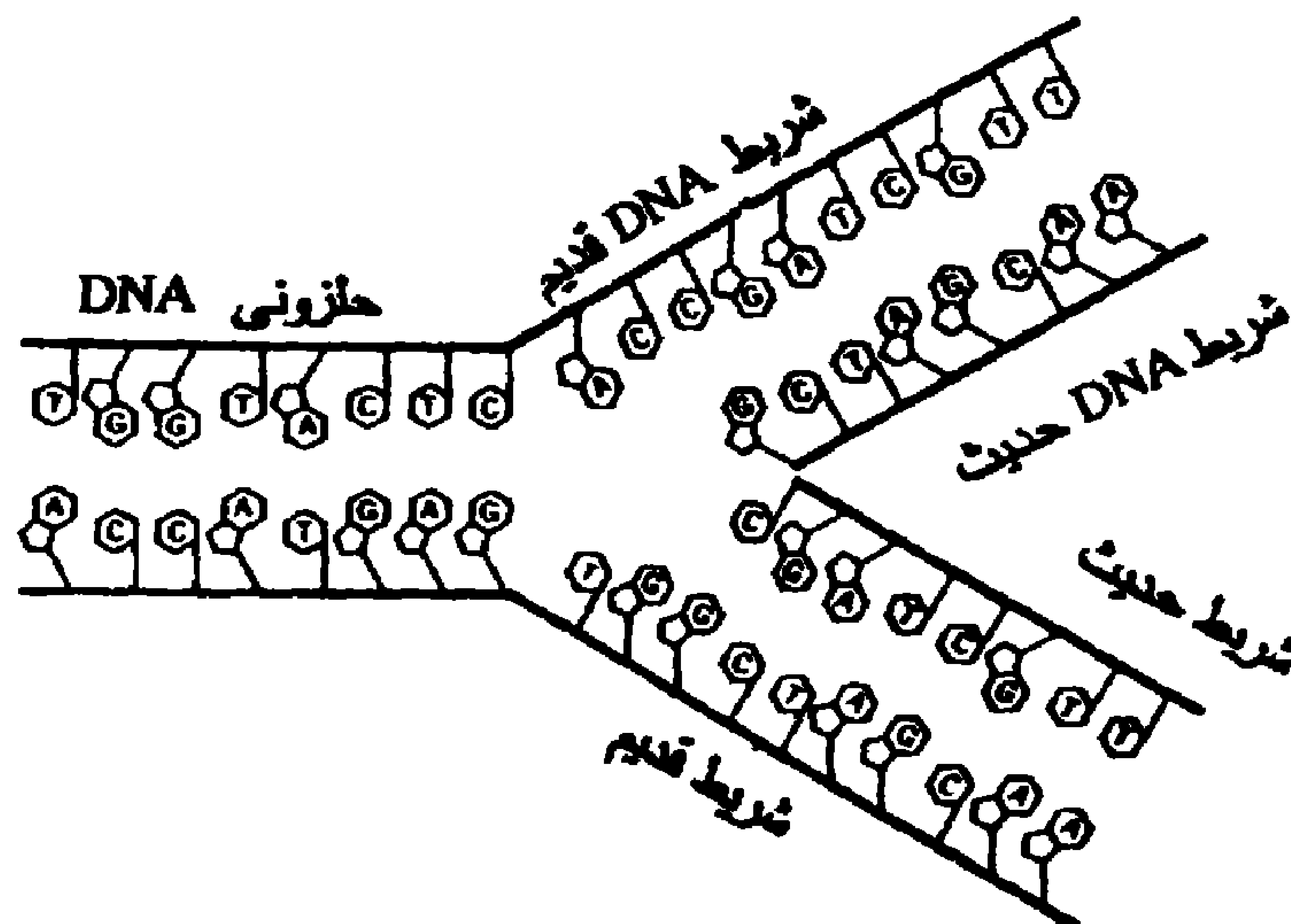
قبل أن تبدأ الخلية فى الإنقسام تتضاعف كمية DNA بها حتى تستقبل كل خلية جديدة نسخة طبق الأصل من المعلومات الوراثية الخاصة بالخلية الأم، ويحدث ذلك اثناء الطور البينى interphase فى اثناء خطوات إنقسام الخلية، ولقد أشار كل من واطسن وكريك إلى أن تركيب الشريط المزدوج ذى القواعد المتزاوجة لجزىء DNA يحتوى على وسيلة يمكن بها مضاعفة المعلومات الوراثية بدقة. فحيث إن الشريطين يحتويان على قواعد متكاملة، فإن تتابع النيوكليوتيدات فى كل شريط يوفر المعلومات اللازمة لإنتاج الشريط المقابل فمثلاً إذا كان تتابع القواعد النيتروجينية فى جزء من الشريط هو (5´A-A-T-C-C3´) فإن قطعة الشريط التى تتكامل معها يكون ترتيب قواعدها النيتروجينية (3´T-T-A-G-G5´) فإذا ما تم فصل شريطى DNA عن بعضهما البعض فإن أيا منهما يمكن أن يعمل كقالب لإنتاج شريط يتكامل معه. ولقد قام العلماء بإجراء العديد من التجارب للتأكد من ذلك.

وبإستخدام سلسلة من التجارب تمكن كل من ميسلسون Meselson وستال Stahl من إثبات طريقة تضاعف DNA وملخصها أن شريطى DNA ينفصلان عن بعضهما بكسر الروابط الإيدروجينية التى تربط القواعد المتزاوجة ويعمل كل شريط من الشريطين كقالب لبناء شريط جديد ثم يتم تكوين روابط إيدروجينية بين القواعد المتزاوجة للربط بين شريطين أحدهما جديد والآخر قديم. وعند إنقسام الخية ترث كل خلية جديدة جزىء DNA هجين أى يتكون من شريط قديم وآخر جديد. ولقد أجرى ميسلسون وستال تجاربهما على البكتيريا إلا أنه من الواضح الآن أن DNA فى كل الكائنات الحية يتضاعف بنفس الطريقة. ومما هو جدير بالذكر فإن العلماء قد تمكنوا من عمل عملية تضاعف DNA فى أنبوبة الإختبار فى المعمل وذلك فى وجود بعض

المركبات النقية ومنها البروتينات والإنزيمات. ولذلك أمكن فهم ميكانيكية وكيفية حدوث تضاعف DNA بالتفصيل كما سيلى شرحه (شكل ٥٢، ٥٣).

تبدأ العملية بأن يرتبط بروتين بحلزونى DNA وهذا البروتين هو عبارة عن إنزيمات فك حلزونى DNA وتسمى DNA-helicases. تتحرك هذه الإنزيمات على جزىء DNA من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر مسببة فك وفصل حلزونى DNA وينفصل الشريطان عن بعضهما ويبتعد كل منهما عن الآخر. يمكن تشبيه ذلك بأن الإنزيم هو إنزيم السوستة وعند شد الإنزيم تنفتح وينفصل شريطى السوستة عن بعضهما unzipping the zipper.

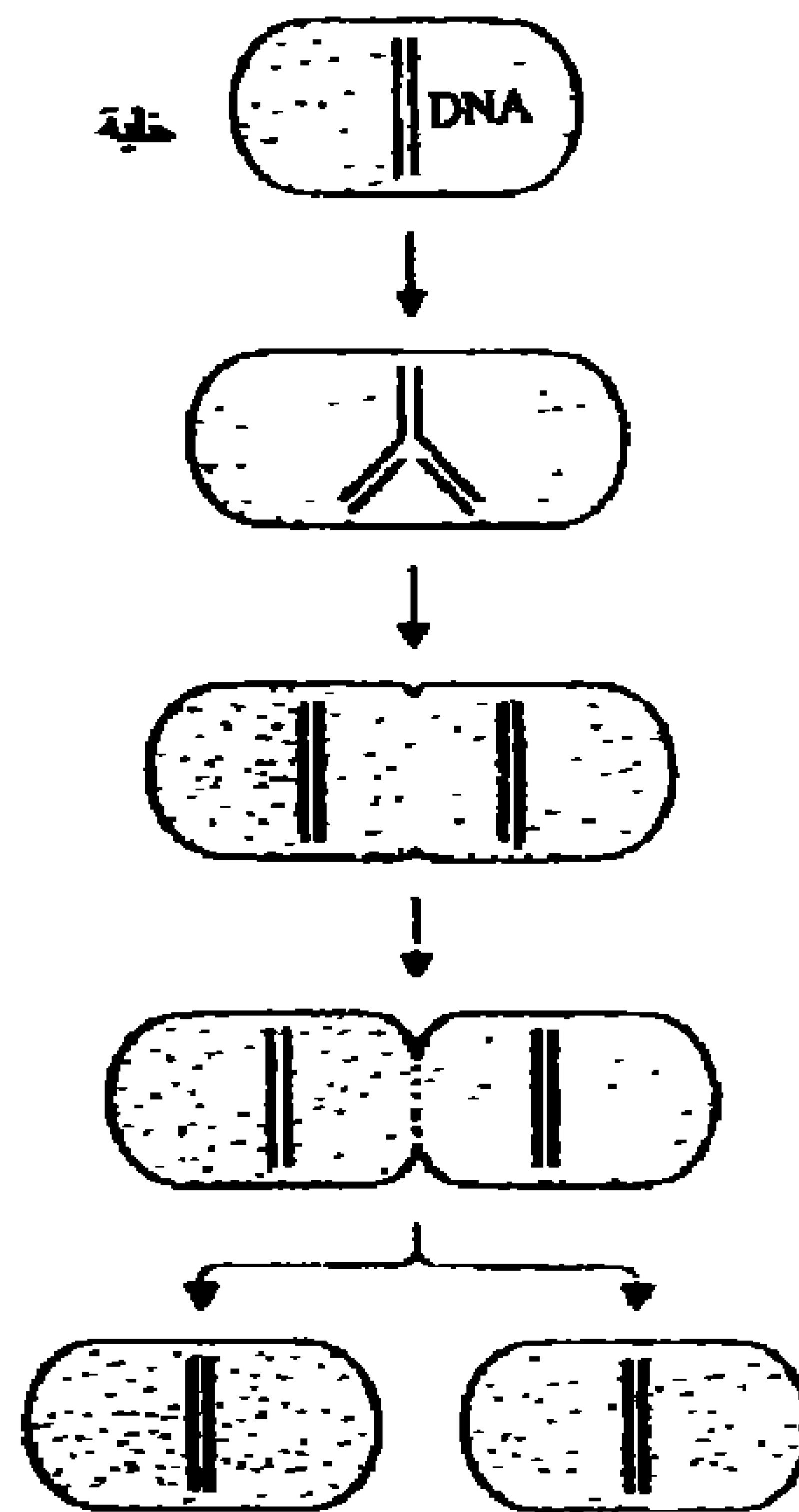
أما البناء الفعلى لحلزونى DNA الجديدان فتقوم بها أحد إنزيمات البلمرة وهى DNA polymerases والتى تساعد على إضافة النيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى وتتميز هذه الإنزيمات بأنها تعمل فى إتجاه واحد فقط unidirectional والتى تساعد على إضافة النيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى إلى النهاية ´3 لشريط DNA الجديد.



شكل ٥٢: تضاعف الـ DNA أى تضاعف شريطين أى حلزونى الـ DNA.

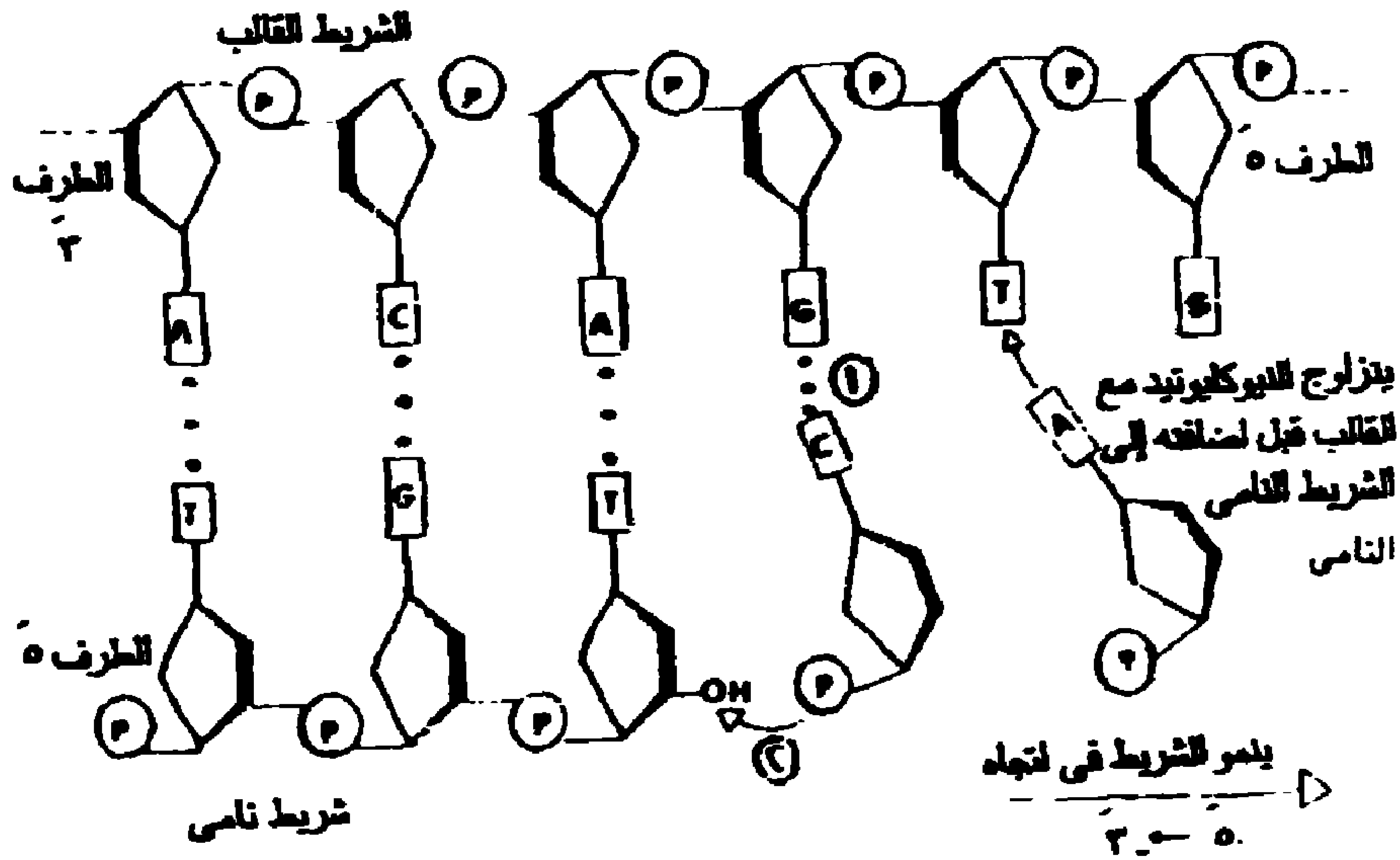
ولكى يتم إضافة النيوكليوتيدة إلى الشريط الجديد لابد أن تتزاوج القاعدة النيتروجينية فى النيوكليوتيدة مع القاعدة النيتروجينية الموجودة على شريط القالب

(شكل ٥٤) وهكذا يتكرر ذلك فى جميع الحالات وعامة ومن المعروف أن إنزيم البلمرة يعمل فى إتجاه واحد فقط من الطرف ´5 إلى إتجاه ´3 للشريط الجديد الذى يجرى بناؤه. ولقد سبق أن ذكرنا أن شريطى لوب DNA المزدوج متوازيان عكسياً، أى أن أحدهما يكون فى إتجاه ´5 إلى ´3 بينما الشريط المتزاوج معه يتوجه فى الإتجاه المعاكس أى فى إتجاه ´3 إلى ´5. وعلى ذلك فعندما يعمل إنزيم فك الحلزون على فصل شريطى جزيىء DNA يتم ذلك فى إتجاه النهاية ´3 لأحد الشريطين والنهاية ´5 للشريط الآخر. وبالنسبة للشريط القالب ´3-´5 ليست هناك مشكلة حيث أن إنزيم البلمرة يتبع إنزيم فك الحلزون مباشرة مضيفاً نيوكليوتيدات جديدة إلى الطرف ´3.



شكل ٥٣: خطوات إنقسام خلية إلى خليتين وتضاعف جزىء DNA.

إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس، وذلك لأن إنزيم البلمرة لا يعمل فى إتجاه ´5-´3. هذا الشريط يتم بناؤه على شكل قطع صغيرة فى إتجاه ´5-´3 بواسطة إنزيم بلمرة آخر polymerase B (شكل ٥٥) ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها البعض بواسطة إنزيم الربط DNA-ligase.

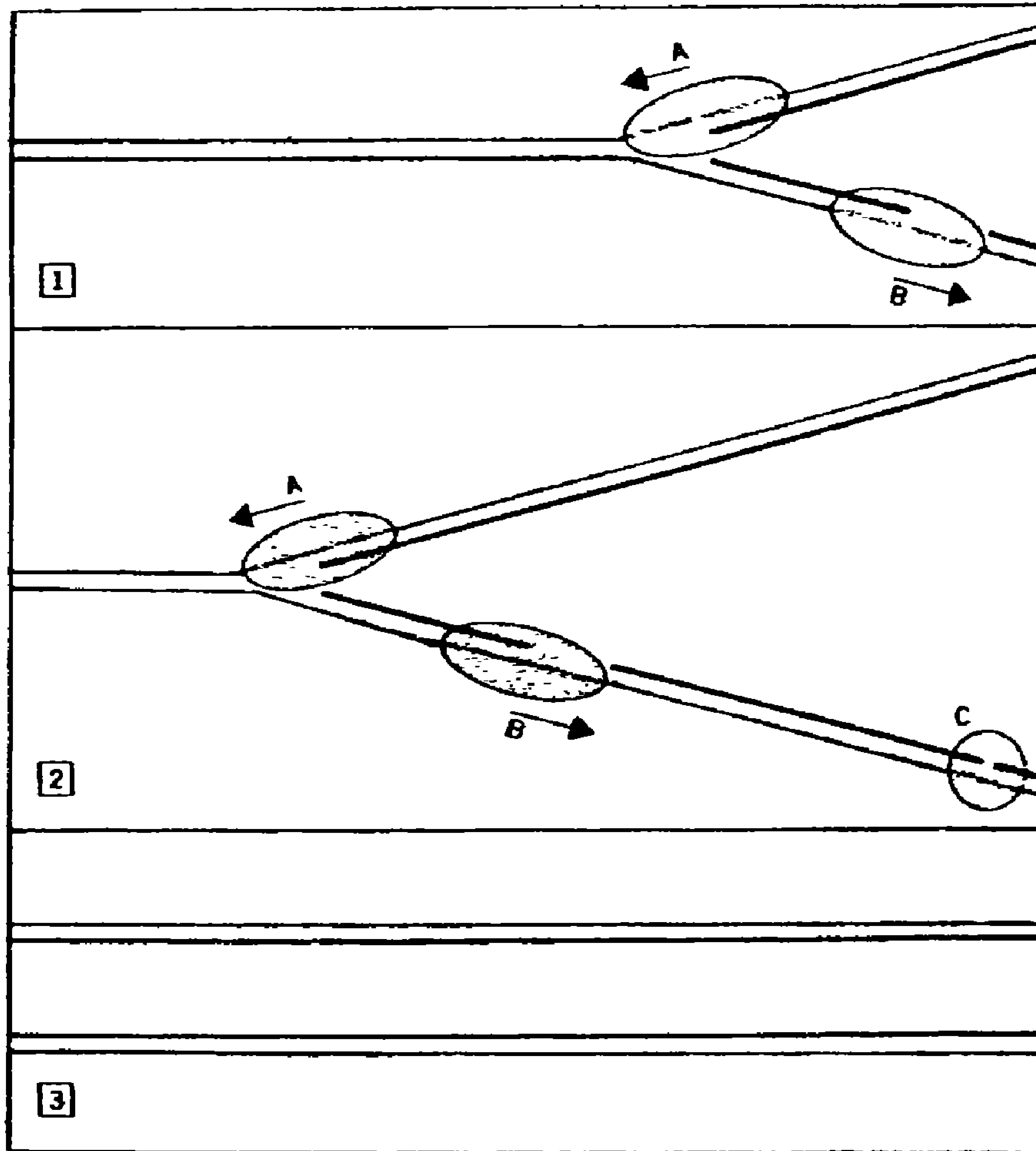


شكل ٥٤: الطريقة التى يعمل بها إنزيم DNA-Polymerase فى مضاعفة أحد أشـــرطة DNA. (١) تتزاوج القواعد النيتروجينية مع المتكامل معها على الشريط القالب، (٢) يقوم DNA-polymerase بربط النيوكليوتيدات المتزاوجة فى الشريط النامى.

أما عن طريق إنقسام الكروموسوم البكتيرى فى البكتيريا *E. coli* فقد تمكن كيرنس Cairns عام ١٩٦٣ من وضع أسس إنقسام هذا الكروموسوم. حيـــث أن تضـــاعف الكروموسوم يبدأ عند منطقة معينة فى محيط الكروموسوم ثم يحدث فـــك لحلزونـــى الكروموسوم تدريجياً ويحدث فى نفس الوقت تضاعف لكل شريط وهكذا تحدث عملية الفك والتضاعف تدريجياً حتى يتم تضاعف الكروموسوم تماماً. وملخص هذه العملية أنه يحدث كسر فى أحد حلزونى DNA عند منطقة معينـــة تســـمى منطقـــة البدايـــة initiation site ثم يحدث فك لحلزونى DNA تدريجياً وفى نفس الوقت يتضاعف DNA.

أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء إنقسام الخلايـــا تنفصـــل شـــبه النـــواة المنقسمة أى المادة النووية عن بعضها أى تبتعد عن بعضها. ويلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخلية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيـــوان العادية eukaryotes. حيث أن إنفصال الكروموسوم فـــى خلايـــا النبـــات والإنســـان واليحوان العادية أثناء الإنقسام يحدث نتيجة لإتصال سنتروميرالكروموسوم بـــبعض خيوط المغزل وهى عبارة عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكمش هـــذه

الخيوط أو الأنابيب فى إتجاه أحد قطبى الخية وبذلك تبتعد الكروموسومات عن بعضها متحركة فى إتجاه قطبى الخلية أثناء الطور الإنفصالى. هذه الخيوط وهـذه الأنابيـب غير موجودة فى الخلية البكتيرية فكيف يحدث الإنفصال بـين الكروموسـومين فـى الخلية البكتيرية؟. وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب وبرينر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin عـام ١٩٦٣ نظريـة التضـاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيرى وقد سبق شرح ذلك فى بآب الأحماض النووية.



شكل ٥٥ : إنزيم DNA Polymerase منه النوع A الذى يخلق شريط متكامـل مـن DNA فى إتجاه فرع الشوكة ولكن النوع B من هذا الإنزيم لا يخلق شريط متكامـل مـن DNA بل يخلق أجزاء متقطعة من شريط DNA فى الإتجاه العكسى على الشريط الآخر من DNA ثم تربط هذه الأجزاء بواسطة إنزيم الربط أى الألتحام ligase ويرمز له بـالرمز C وفى النهاية يتكون شريطين جديدين متكاملين من DNA.

يعتبر DNA جزيىء يكرر نفسه ذاتياً self-replicating ويوجد فى صورة جزيىء طويل يحتوى ملايين من أزواج النيوكليوتيدات فى الكروموسوم وقد يوجد فى صورة أصغر حيث يحتوى علـــى آلاف أو مئـــات الآلاف مـــن أزواج النيوكليوتيـــدات فـــى البلازميدات. يمكن أن تنتقل بعض البلازميدات فى داخل الخلية وتلتحم بالكروموسوم وتصبح جزء منه وذلك فى نفس الخلية ونفس العائل ويمكن أن يكون أكثر من ذلـــك أنها يمكن أن تلتحم بكروموسومات أى صبغيات عائل آخر. تحتوى الفيروسات على DNA أو RNA ويمكن أن تعبر عن expression تركيبها بواســـطة mRNA خـــاص بكل جين. إكتشف هـــاملتون Hamilton عـــام ١٩٧٠ أو إنـــزيم محـــدد لجـــزىء restriction endonuclease DNA وهو إنزيم يقوم بطقع جزيىء DNA فـــى أمـــاكن معينة بعد تتابع نيوكليوتيدات معينة. تمكن كل من بوير وكوهين Chohen و Boyer عام ١٩٧٣ من إدخال جينات غريبة إلى البلازميد ثم إدخال البلازميـــد فـــى خلايـــا البكتيريا وهذه الخلايا الأخيرة بدورها تتكاثر ونتيجة لذلك يتكاثر أيضاً الجين الغريب الذى يحمله البلازميد وهذه الخطوات المختلفة تسمى gene cloning. أمكـــن إدخـــال جين من الثدييات فى DNA الفاج وذلك لأول مرة عام ١٩٧٥. وفى نفس العام أمكن الحصول على خلية هجين a hybrid cell بين خلية طحال spleen cell قـــادرة علـــى تكوين أجســـام مضـــادة antibody-producing spleen cell وخليـــة ورم ســـرطانى tumor cell تلقائياً بدرجة ملحوظة monoclonal بإستمرار. وأمكن التعـــرف علـــى تتابع أزواج النيوكليوتيدات فى جزيىء DNA هذه الخلية الهجين بواسطة إنزيمـــات القطع المحدد restriction enzymes. تمكن Sanger ومساعدوه عـــام ١٩٧٧ مـــن معرفة وتتابع ٥٣٨٦ زوج من النيوكليوتيدات فى DNA الفاج المعروف بإسم ϕX 174 وفى نفس العام أيضاً إكتشف أن جزيىء DNA فى النواة توجد فيه أجزاء عبارة عن جينات وأجزاء أخرى ليست جينات ولذلك فإن الجينات المختلفة لا تكـــون مســـتمرة على جزىء DNA بل تنفصل إلى أجزاء نتيجة لوجود أجزاء DNA غير جينية non gene DNA. وفى نفس السنة أيضاً إكتشف لأول مرة تتابع كامل للنيوكليوتيدات لأحد جينات الثدييات وهو جين خاص بالجلوبين globin. ولأول مرة فى عام ١٩٧٩ أمكن

إدخال DNA غريب فى DNA خلية كائن حقيقى النواة وهى خليــة فطــر الخميــرة. ولأول مرة فى عام ١٩٨٠ أمكن إدخال جينات غريبة فى نواة خلايا الثدييات وذلــك فى الفيران وأيضاً أظهرت هذه الجينات خواصها expressed فى خلايا الفيران.

يعتبر ما سبق إضافات فى علم الهندسة الوراثية ويوجد أيضاً إضافات فــى علــم مزارع الأنسجة وفيما يلى موجز لذلك. يعتبر عام ١٩٣٤ هو بدايــة علــم مــزارع الأنسجة عندما تمكن هوايت White من فصل القمة النامية لجذور الطماطم وتنميتها على بيئة سائلة ونتج عن ذلك جذور عادية. تمكن هوايت وآخرون عام ١٩٣٩ مــن الحصول على مزارع صناعية لنسيج الكاس من نخاع ساق الدخان وأيضاً من جذور الجزر. تمكن بول Ball عام ١٩٤٦ من قطع القمة النامية للساق وزراعتها على بيئة صناعية وأنتج منها نبات كامل. أمكن إثبات عام ١٩٥١ أن قطع القمة النامية للساق بطول ١٠٠ إلى ٢٥٠ ميكرون وتحمل بدائيات ورقتين خضــريتين فقــط يمكــن أن يتكون منها نبات كامل. تمكن موير Muir عام ١٩٥٣ من فصل خلايا مفــردة مــن نسيج الكالس وأمكن تنمية هذه الخلايا المنفردة. أثبــت ســتيورات Stewart عــام ١٩٥٨ أن معلق خلايا الجزر carrot suspension cultures يمكن أن يــرزع علــى بيئات صناعية وينتج منه أشباه أجنة embryoid أى أنه لأول مرة يمكن إنتاج أجنــة من خلايا خضرية غير تناسلية وهذا ما أمكن عمله حديثاً فى الحيوانات الثديية وأنتج النعجة دوللى وغيرها وبالطبع تصلح هذه التجارب لتطبيقها على الإنســان. وتمكــن كوكنج Cocking عام ١٩٦٠ من الحصول على بروتوبلاست خلايــا النبــات وذلــك نتيجة لمعاملة جدر الخلايا بإنزيمات هاضمة أى محللة لجدر الخلايا. تمكــن تاكيبــا Takeba ومساعدوه عام ١٩٧١ من إنتاج نبات كامل من بروتوبلاست خلايا النسيج الوسطى أى الميزوفيل لنبات التبغ. تمكن جوها Guha عام ١٩٦٦ من الحصول على نبات أحادى haploid من حبوب اللقاح.

وفى مجال التطبيق للهندسة الوراثية ومزارع الأنسجة بالنسبة للنبــات تســتعمل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى فى كثير مــن

النباتات. يعتبر كلا من هوايت وبراون White, Braun عام ١٩٤٢ أول من تمكنا من الحصول على ورم لهذه البكتيريا خال من البكتيريا قادر على النمو ذاتياً autonomously growing إستخدمت أيضاً مزارع الأنسجة للقمة النامية للساق للحصول على نباتات خالية من الإصابة بالفيروس. إستخدمت مزارع البروتوبلاست في دراسة عملية الإصابة بالفيروسات وأيضاً دراسة تكاثر الفيروسات ودراسة تأثير سموم الطفيليات النباتية على النبات. إستخدم التزاوج بين البروتوبلاست للحصول على هجين مقاوم للأمراض. إستخدمت الهندسة الوراثية في التعرف على طبيعة مسبب تكوين الأورام nature of the tumor-inducing principal في حالة بكتيريا التدرن التاجي كما إستخدمت الهندسة الوراثية أيضاً في التعرف على التركيب الوراثي للبكتيريا والفيروس.

يعتبر إستخدام البكتيريا *Agrobacterium* وبعض الفيروسات النباتية كمستقبل وحامل وناقل لجينات غريبة ثم نقل هذه الجينات الغريبة إلى النبات سيفتح مجال كبير في عمل تحوير في التركيب الوراثي للنبات genetic transformations of plants وبذلك يتم عمل ثورة في التركيب الوراثي للنبات غير معروف مداه ودرجة الإستفادة منه في الوقت الحاضر. كما يمكن أن تستخدم البكتيريا الأخرى والفيروسات لنقل جينات إلى الحيوان أو العكس نقل جينات من الإنسان والحيوان إلى البكتيريا وقد أحدث ذلك بالفعل ثورة علمية منها إنتاج الإنسولين البشري بواسطة البكتيريا.

ملحوظة:

سيتم شرح تضاعف دنا بالتفصيل في كتاب آخر إن شاء الله.

الباب الرابع

الشفرة الوراثية

الشفـــرة الـــوراثيـــة

The Genetic Code

من المعروف أنه توجد أحماض أمينية كثيرة ولكن يوجد منها أحمـــاض أمينيـــة أساسية essential amino acids وهى الأحماض التى تدخل فى تركيـــب البروتينـــات وأما الأحماض الأمينية الأخرى الغير أساسية فإنها لا تدخل فى تركيب البروتينـــات. ومن المعروف أنه يوجد عشرون حامض أمينى أساسى وســيتناول شـــرح الشـــفرة الوراثية فى هذه الأحماض الأمينية الأساسية دون غيرها.

من المعروف أن هناك عشرين حامض أمينى مختلفة تدخل فى بناء البروتينـــات وأن هناك أربع قواعد نيتروجينية – نيوكليوتيدات – فقط تدخل فى بناء كل من DNA و RNA وعلى ذلك ((فاللغة)) الوراثية تحتوى على أربعة ((حروف أبجدية)) وهـــذه الحروف الأربعة من القواعد النيتروجينية يجب أن تشكل عشرين ((كلمة)) تدل كـــل منها على حمض أمينى معين، ولا يمكن أن تتكون كل كلمة من حرف واحد لأن ذلك يعنى وجود أربع كلمات فقط على صورة شفرة هـــى A,G,C,U والبروتينـــات بـــذلك تحتوى على أربعة أحماض أمينية فقط وبالمثل فإن الكلمات لا يمكن أن تتكون مـــن حرفين (نيوكليوتيدتين) وذلك لأن القواعد النيتروجينية الأربعة إذا رتبـــت فـــى كـــل الإحتمالات الممكنة لإثنين معاً تعطى $٤^{٢}$ = ١٦ كلمة شفرة codon مختلفـــة وهـــذا مازال غير كاف للعشرين حمضاً أمينياً التى تدخل فى بناء البروتين، أمـــا إذا رتبـــت الأربع حروف (قواعد نيتروجينية – نيوكليوتيدات) على شكل ثلاثيات فإنهـــا ســـتنتج $٤^{٣}$ = ٦٤ كلمة شفرة وهذا أكثر من الحاجة لتكوين كلمة شفرة لكل حامض أمينـــى، وعلى ذلك فأصغير حجم نظرى لكلمة شفرة DNA هو ثلاث نيوكليوتيدات أى ثلاثـــة قواعد نيتروجينية، الإختلاف الوحيد بين النيوكليوتيدات فى القواعد النيتروجينية. تم فى عام ١٩٦٥ الوصول إلى الشفرات الخاصة بكل حمض أمينى والتى يطلق عليهـــا

اسم كودونات. وهذه الكودونات موجودة فى جدول (رقم ٥، ٦) مع ملاحظة أن الكودونات فى هذا الجدول هى الكودونات التى توجد فى mRNA، أما ثلاثيات شفرة DNA فهى النيوكليوتيدات التى تتكامل قواعدها مع تلك الموجودة فى الجدول. كما يتضح من الجدول أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أمينى، كما أن هناك كودونا لبدء البروتين وهو AUG وثلاثة كودونات (UGA, UAA, UAG) توقف بناء البروتين أى أنها تعطى إشارة عند النقطة التى يجب أن تقف عندها آلية بناء البروتين وتنتهى سلسلة عديد الببتيد. ذكر أن GUG كودون لبدء البروتين أيضاً (Freifider، Cronan، Maloy عام ١٩٩٤).

والشفرة الوراثية عامة universal – بمعنى أن نفس الكودونات تمثل شفرات لنفس الأحماض الأمينية فى كل الكائنات الحية مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والنباتات والحيوانات والإنسان والفطريات التى تمت دراستها حتى الآن وهذا دليل قوى على أن كل الكائنات الحية الموجودة الآن على وجه الأرض تعتبر continuum قد نشأت عن أسلاف مشتركة، ولقد كان للمجموعات الرئيسية من الكائنات الحية تاريخ تطورى منفصل لمئات الملايين من السنين، وعلى ذلك يظهر أن الشفرة قد تكونت بعد فترة قصيرة من بدء الحياة واستمرت بدون تغير تقريباً لبلايين السنين منذ ذلك الوقت ونتيجة لذلك حدث التطور فى المملكة الحيوانية حتى الأكثر رقياً وهو الإنسان وحدث التطور فى المملكة النباتية حتى الأكثر رقياً وهى النباتات الزهرية وأكثر النباتات الزهرية تطوراً هى نباتات العائلة (الفصيلة) المركبة. وأيضاً فى المملكة الحيوانية من الحيوانات الأولية – البروتوزوا – عبر المائيات إلى الحيوانات الثديية ومنها الإنسان. وأيضاً التطور من بدائيات النواة إلى حقيقات النواة.

جدول ٥: الكودونات كما توجد فى mRNA الكودونات داخل المربع للبداية.

First position	Second				Third position
(5´ end)	U	C	A	G	(3´ end)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	His	Arg	A
	Leu	Pro	His	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Note: The boxed condons are used for initiation.

جدول ٦: الكودونات كما توجد فى mRNA.

القاعدة	القاعدة الثانية				القاعدة
الأولى	U	C	A	G	الثالثة
U	UUU Phenylalanine	UCU Serine	UAU Tyrosine	UGU Cysteine	U
	UUC Phenylalanine	UCC Serine	UAC Tyrosine	UGC Cysteine	C
	UUA Leucine	UCA Serine	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leucine	UCG Serine	UAG Stop	UGG Tryptophan	G
C	CUU Leucine	CCU Proline	CAU Histidine	CGU Arginine	U
	CUC Leucine	CCC Proline	CAC Histidine	CGC Arginine	C
	CUA Leucine	CCA Proline	CAA Histidine	CGA Arginine	A
	CUG Leucine	CCG Proline	CAG Histidine	CGG Arginine	G
A	AUU Isoleucine	ACU Threonine	AAU Asdparagine	AGU Serine	U
	AUC Isoleucine	ACC Threonine	AAC Asdparagine	AGC Serine	C
	AUA Isoleucine	ACA Threonine	AAA Lysine	AGC Arginine	A
	AUG(START) Methionine	ACG Threonine	AAG Lysine	AGG Arginine	G
G	GUU Valine	GCU Alanine	GAU Asparagine	GGU Clycine	U
	GUC Valine	GCC Alanine	GAC Asparagine	GGC Glycine	C
	GUA Valine	GCA Alanine	GAA Glutamic acid	GGA Glycine	A
	GUG Valine	GGG Alanine	GAG Glutamic acid	GGG Glycine	G

تخليق البروتينات

Protein Synthesis

تخليق البروتين يحتاج تواجد أحماض أمينية حرة بالخلية ويحتاج أيضاً بعض من الإنزيمات ولابد أيضاً من تواجد الريبوسومات بالخلية. كما يقوم RNA بدور رئيسى فى هذه العملية. يوجد ثلاثة أنواع من RNA تسهم فى بناء البروتين وهى:

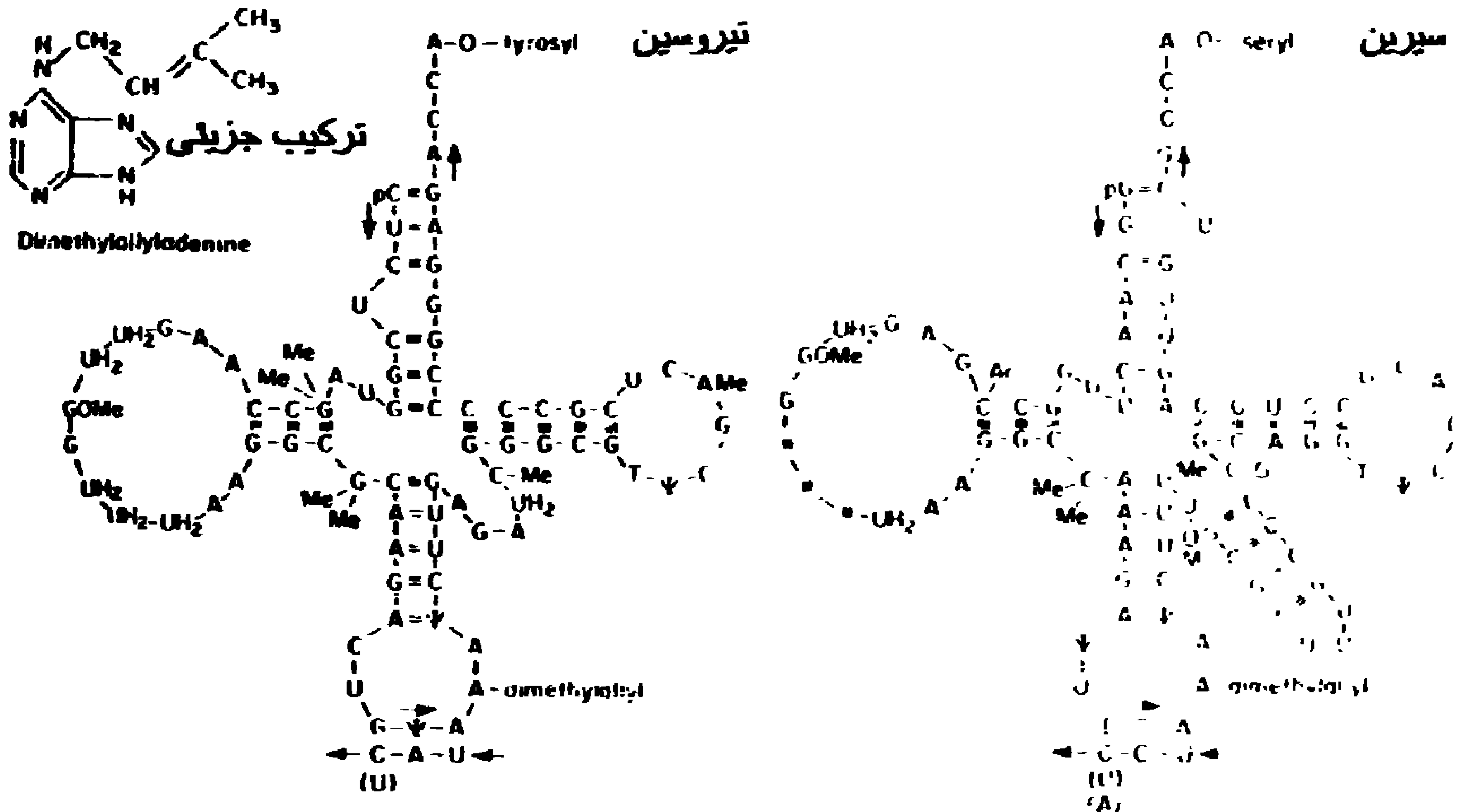
١ – حمض RNA الرسول Messenger RNA (mRNA) وهو عبارة عن خيط رفيع ويمكن رؤيته بالمجهر الإلكترونى وهو غير ثابت ويتغير وزنه الجزيئى تبعاً لنوع الخلية وتبعاً لنوع البروتين الذى يقوم ببناؤه فقد نجده قصير كما فى نوع يسمى leader RNA أى RNA القائد وقد يكون طوله عادى فى كثير من الأحوال. يتراوح وزنه الجزيئى من خمسون ألف إلى ٥ ملون دالتون. وهو الذى يحمل الشفرة التى تتحدد تتابع الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيب البروتين.

٢ – حمض RNA الريبوسومى rRNA Ribosomal RNA) – يدخل فى بناء الريبوسومات (أماكن بناء البروتين) عدة أنواع من RNA الريبوسومى وحوالى ٧٠ نوعاً من عديد الببتيد، ويتم بناء الريبوسومات فى حقيقيات النواة فى منطقة من النواة تسمى النوية، يتم بها بناء الآلاف من الريبوسومات فى الساعة، ومما يجعل هذا المعدل السريع ممكناً هو أن DNA فى خلايا حقيقيات النواة يحتوى على ما يزيد على ٦٠٠ نسخة من جينات RNA الريبوسومى التى ينسخ منها rRNA، وهناك أربعة أنواع مختلفة من rRNA تدخل مع البروتين فى بناء الريبوسومات. وهو مكون رئيسى للريبوسومات وإن كان الدور الذى يلعبه فى بناء البروتين مازال غير معروف حتى الآن.

٣ – حمض RNA الناقل Transfer RNA (tRNA) – تلتف أجزاء من الجزىء لتكون حلقات وبذلك يصبح الجزىء عبارة عن قدم وساق وفروع تنتهى

بحلقات. يختلف عدد الفروع والحلقات بإختلاف الجزيىء زعادة تكون الفروع إثنان أو ثلاثة وكذلك الحلقات. وهو يتكون من نيوكليوتيدات عديدة وعادة عددها حوالى ثمانون. توجد روابط إيدروجينية تصل أدنين ويوراسيل وبين سيتزسين وجوانين فى كل من الساق والفروع أما القاعدة والحلقات فلا يوجد بها قواعد إيدروجينية.

وقد وجد فى النباتات الزهرية أن بعض الأحماض الأمينية يحتاج إلى مركب سيتوكينين والبعض الآخر لا يحتاج. فمثلاً فى حالة الحامض الأمينى سيرين والحامض الأمينى تيروسين والحامض الأمينى أيزوليوسين تحتاج إلى مركب سيتوكينين وهو مركب (شكل ٥٦) dimethyallyl adenine (DMAA).



شكل ٥٦: جزىء tRNA ناقل للحامض الأمينى سيرين وآخر ناقل للحامض الأمينى تيروسين مع وجود مركب dimethylallyl adenine (DMAA) بالقرب من anticodon.

الداى ميثيل الايل أدينين DMAA. وفى حالة tRNA للحامض الأمينى أرجينين وفالين وجليسين وفينيل ألانين لا يتكون ولا يحتاج إلى مركب سيتوكينين. أما أهمية المركب السيتوكينينى لـ tRNA فإنه لابد من وجوده لكى يحدث إرتباط بين مقابل الكودون anticodon فى tRNA والجزء المخصص له على كودون mRNA.

وهناك موقعان هامان على جزيىء tRNA لهما دخل بناء البروتين، الموقع الأول يوجد فى قمة الجزىء هو الذى يتحد فيه الجزيىء بالحمض الأمينى الخاص به، ويتكون هذا الموقع من الثلاث قواعد CCA أما الموقع الآخر هو السطح السفلى للقاعدة مقابل الكودون anticodon الذى تتزاوج قواعده مع كودونات mRNA المناسبة عند مركب mRNA والريبوسوم حيث يحدث إرتباط مؤقت بين tRNA و mRNA يسمح للحمض الأمينى المحمول على tRNA أن يدخل فى سلسلة عديد الببتيد فى المكان المحدد. ولهذا النوع دور هام ورئيسى فى بناء البروتين حيث أنه يقوم بحمل الأحماض الأمينية إلى الريبوسومات، ولكل حمض أمينى نوع خاص من RNA يتعرف على الحمض الأمينى وينقله (الأحماض الأمينية التى لها أكثر من شفرة يكون لها أكثر من tRNA)، وينسخ tRNA من جينات tRNA التى توجد عادة على شكل تجمعات من ٧-٨ جينات على نفس الجزء من جزىء DNA.

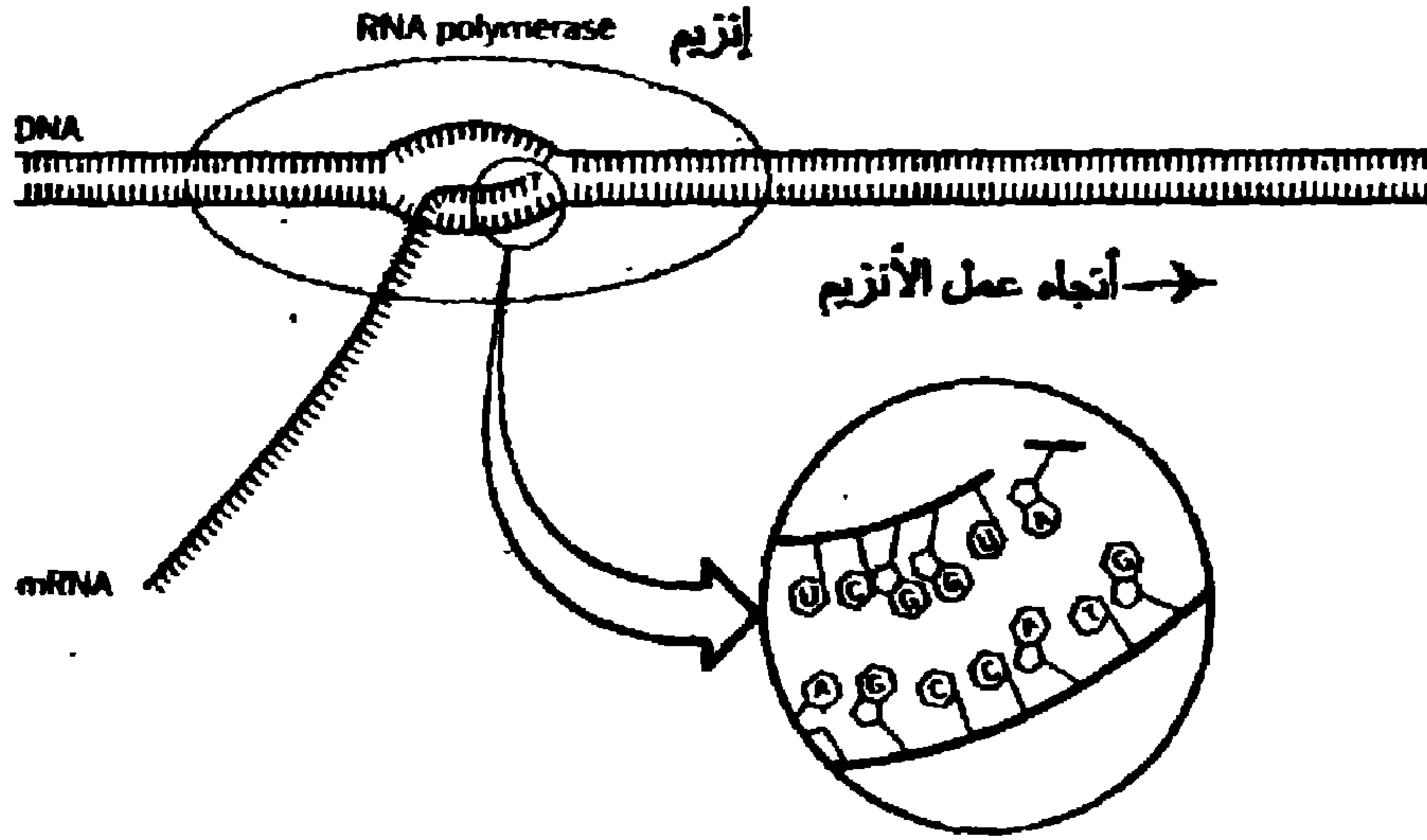
خطوات تخليق البروتين:

تحدث خطوات عديدة متعاقبة فى بناء البروتين وهى ما يأتى:

١- النسخ Transcription:

وهى عبارة عن عملية نسخ DNA إلى RNA أى أن يصبح RNA متوازن ومتكامل فى تركيبه مع شريط DNA الناتج منه. ويحدث ذلك بواسطة إنزيم آخر من إنزيمات البلمرة وهو RNA-polymerase. ويبدأ هذا الإنزيم فى العمل على جزيىء DNA ويسبب فك وإبتعاد شريطى DNA عن بعضهما فى مسفة قصيرة وهى تتراوح بين عشرة إلى عشرون تيكليوتيد ثم يقوم بوضع النيوكليوتيدات المكملة لشريط DNA فى هذه المنطقة ويتم ربطها وهكذا يتحرك الإنزيم عبر جزىء DNA ليكون سلسلة من النيوكليوتيدات والتى يتكون منها mRNA يلاحظ أن النيوكليوتيدات التى يتكون منها تكون حرة فى الخية ،ان الإنزيم يضعها فى مكانها المناسب على شريط DNA ويقوم بربطها (شكل ٥٧).

وبذلك يتكون mRNA مكمل فى تركيبه لشريط DNA ومشابه لــه يختلــف عــن DNA فى إحتوائه على قاعدة يوراسيل بدلاً من الثيمين وأيضــاً فــى وجــود ســكر الريبوز بدلاً من سكر دى أكسى ريبوز، يتوقف عمل الإنزيم عندما يصل إلى شــفرة stop ولذلك تتحرر سلسلة mRNA ولا ترتبط بشريط DNA وتصبح حرة فى الخلية.

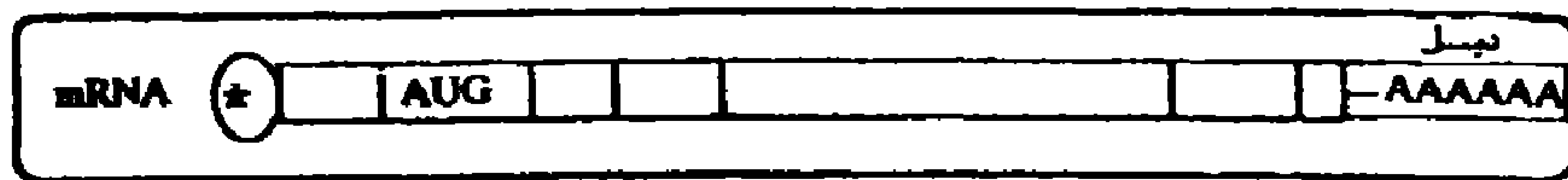


شكل ٥٧: فك شريطى DNA عن بعضهما فى مكان عمل الإنزيم RNA polymerase وتكوين شريط جديد من mRNA أى عملية النسخ.

٢ – الترجمة Translation:

يتكون الريبوسوم من تحت وحدتين أحداهما كبيرة والأخرى أصــغر، وعنــدما لا يكون الريبوسوم قائماً بعمله فى إنتاج البروتين فإن تحت الوحدتين تنفصــلان عــن بعضهما وتتحرك كل منهما بحرية، وقد يرتبط كل منهما بتحت وحدة أخرى من النوع المقابل عندما تبدأ عملية بناء البروتين مرة أخرى. توجد الريبوسومات حــرة فــى سيتوبلازم الخلية أو توجد ملتصقة بسطح الشبكة الأندوبلازمية ويتكون نتيجة لــذلك الشبكة الأندوبلازمية الخشنة. تبدأ عملية الترجمة بإرتباط mRNA بالريبوسوم وغير معروف التفاصيل الدقيقة لعملية الربط. ولكن من المعروف أنه لكل mRNA موقــع إرتباط بالريبوسوم وهو عبارة عن تتابع للنيوكليوتيدات يرتبط بالريبوســومات وأول

ثلاثة نيوكيلوتيدات ترتبط بالريبوسوم تسمى كودون البداية strart codon ويمكن شرح ذلك فى حالة أوليات النواة حيث يرتبط mRNA بالريبوسوم وبحيث يصبح أول كودون أى كودون البداية متجهاً إلى أعلى أى أن العمود الفقرى back bone للجزيىء يكون لأسفل والقواعد النيتروجينية لأعلى وهو الوضع الصحيح للترجمة. يكون هذا الكودون (شكل ٥٨) هو AUG كما فى الجدول إما فى الطرف الآخر من mRNA فيوجد ذيل مكون من حوالى مائتين أدنين A يعتقد أن هذا الذيل يحمى mRNA من التحليل بواسطة الإنزيمات الموجودة فى السيتوبلازم.

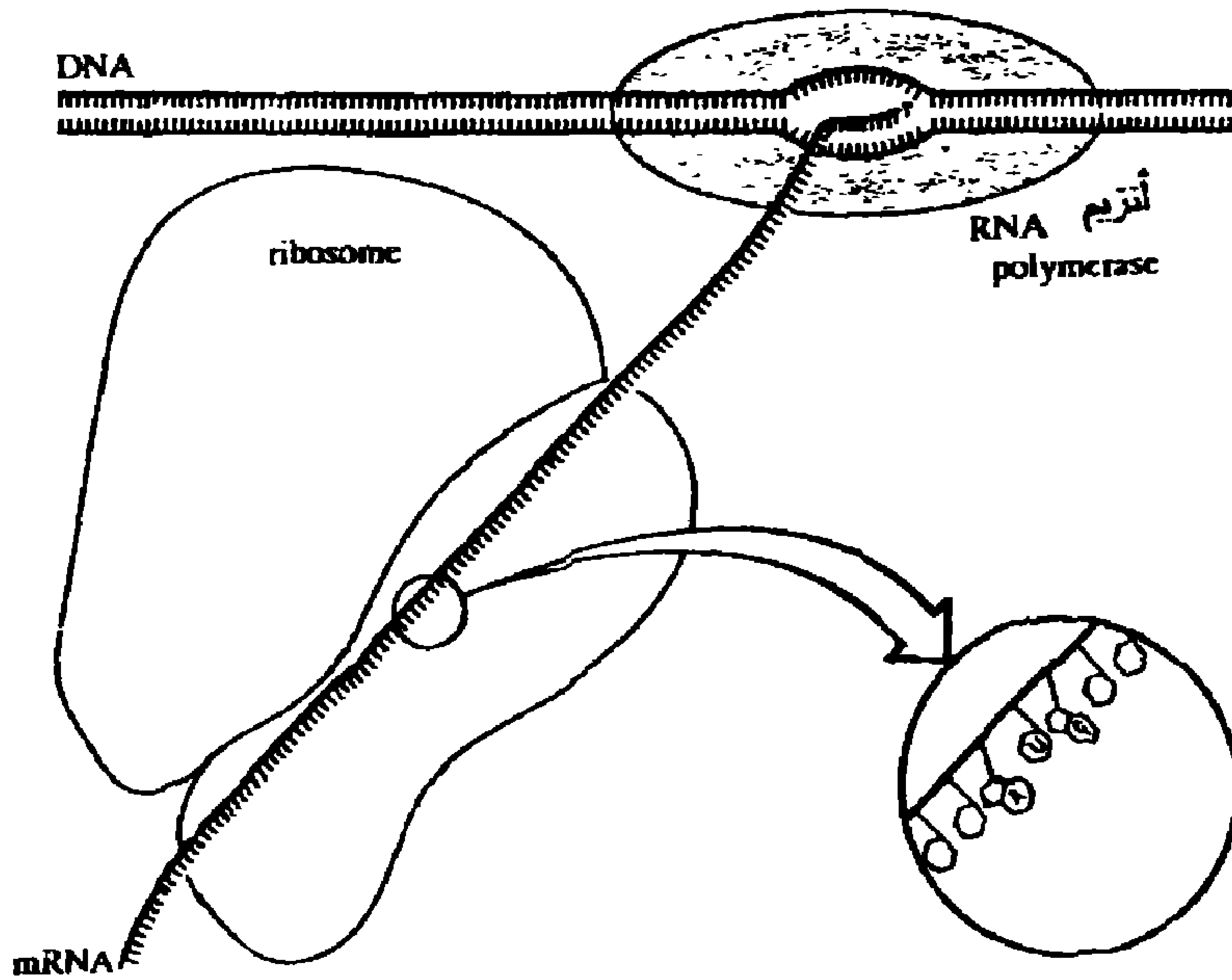


شكل ٥٨: شكل تخطيطي لجزيء mRNA يظهر به موقع الارتباط بالريبوسوم. وذيل عديد الأدينين ويتجه أول كودون به إلى أعلى.

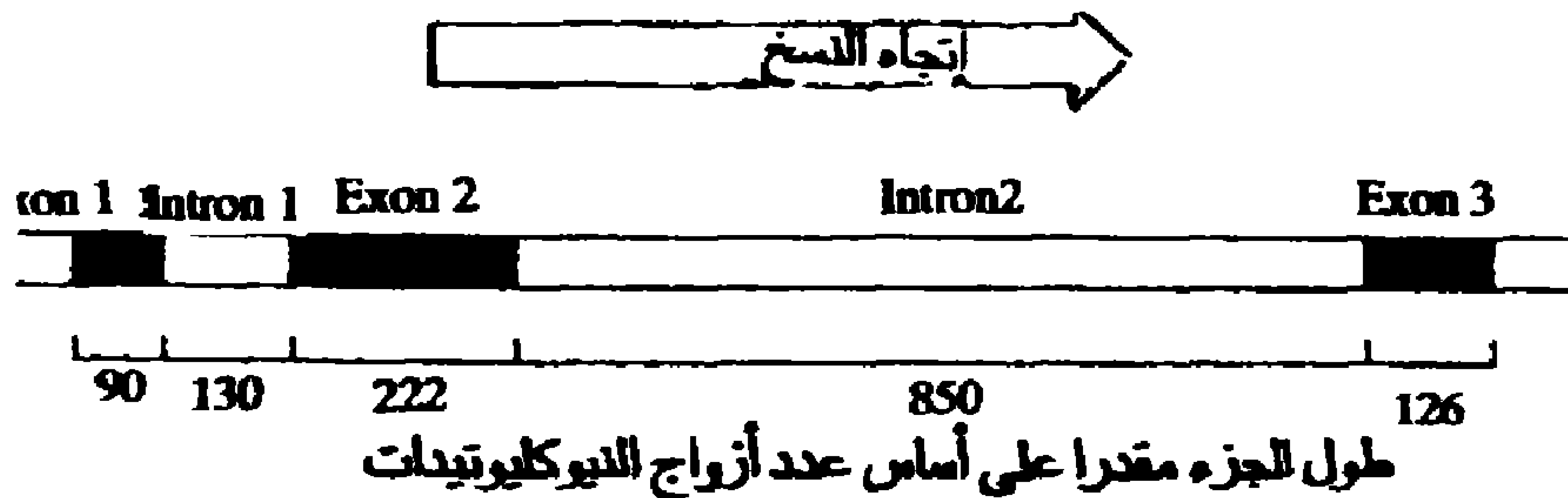
تختلف أوليات النواة عن حقيقيات النواة فى هذه الحالة فقد وجد البكتيريا أن الريبوسومات ترتبط ببداية mRNA وتبدأ حدوث الترجمة وتخليق البروتين بينما يكون الطرف الآخر للجزىء mRNA مازال فى مرحلة البناء على شريط DNA (شكل ٥٩) أما فى جقيقيات النواة فإن mRNA ينفصل تماماً عن شريط DNA ويصبح حر قبل إرتباطه بالريبوسوم ويحدث ذلك فى الإنسان. ويتداخل mRNA فى جميع الحالات مع تحت الوحدة الصغيرة من الريبوسوم وليست مع تحت الوحدة الكبيرة.

تختلف أوليات النواة عن حقيقيات النواة فى فرق آخر جوهرى وهو أن الجين فى حقيقيات النواة يتكون من أجزاء فعالة من النيوكليوتيدات أى أجزاء لها شفرة coding regions وتدخل فى بناء البروتين وتسمى إكسونات exons ويفصل بين هذه الأجزاء الفعالة أجزاء غير فعالة من النيوكليوتيدات أى أجزاء ليس لها شفرة noncoding regions ولا تدخل فى بناء البروتين وتسمى إنترونات introns ومثال

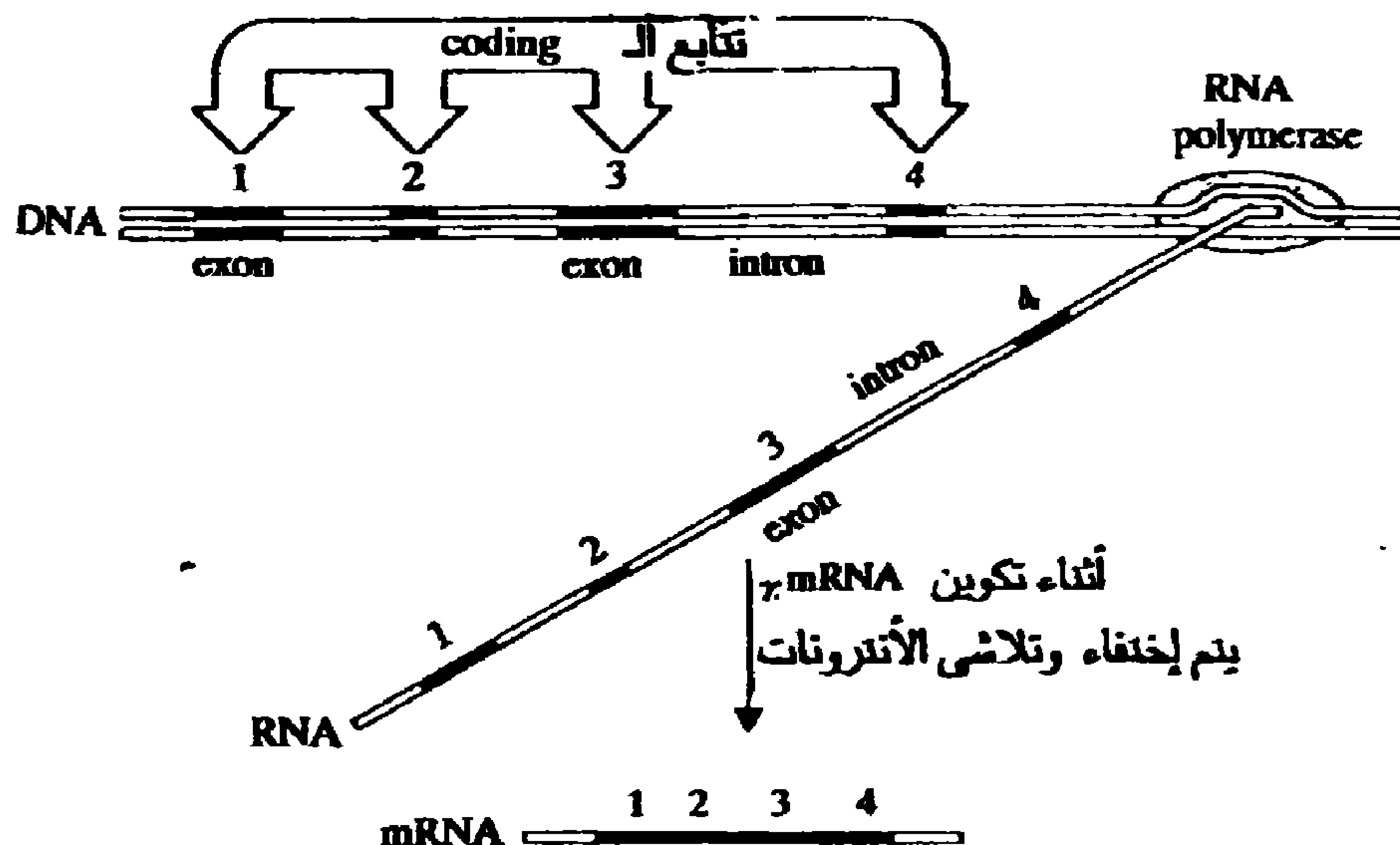
ذلك الجين الموجود فى الإنسان والخاص بتكوين بروتين **β-globin** فإنه يتكون من ثُلاث **exons** وإثنين **introns**. يعتبر **B-globin** أحد مكونات هيموجلوبين الدم (شكل ٦٠).



شكل ٥٩: تكوين **mRNA** من جزئ **DNA** وإرتباطه بالريبوسوم فى كائنات أوليات النواة.



شكل ٦٠: تركيب جين **B-globin** فى الإنسان يتكون من **exons** و **introns** وعدد أزواج النيوكليوتيدات فى كل جزء.



شكل ٦١: إختفاء الإنترونات أثناء تكوين mRNA. جزء من جين يوجد به ٤ أكسونات وأيضاً أنترونات. وأثناء تخليق RNA يوجد به أيضاً إكسونات وأنترونات ولكن عند تمام تكوين mRNA تختفى الأنترونات ولا توجد إلا الإكسونات.

تختلف هذه الأجزاء فى عدد النيوكليوتيدات ففى إكسون رقم ١ يتكون من تسعون زوج وفى إكسون رقم ٢ يتكون من ٢٢٢ زوج وفى إكسون رقم ٣ يتكون من ١٢٦ زوج وفى إنترون رقم ١ يتكون من ١٣٠ زوج وفى إنترون رقم ٢ يتكون من ٨٥٠ زوج. وفى أنواع أخرى من الجينات قد يكون فى الجين الواحد أكثر من خمسون إنترون. ولكن فى أوليات النواة الأمر يختلف حيث أن الجين فى خلايا البكتيريا لا يحتوى إطلاقاً على إنترونات. ولذلك فإن mRNA فى حقيقيات النواة يتكون من مناطق تقابل الإكسونات ومناطق تقابل الأنترونات وذلك فى أثناء تكوينه ولكن عندما يكون قابل للإلتحام بالريبوسوم فإنه يصبح خال من الإنترونات ويصبح قصير (شكل ٦١). ويتضح أن الخلية لها نظام معين يمكن عن طريقه قطع الإنترونات وفصلها من mRNA ولذلك يصبح mRNA فى النهاية خال منها وعبارة عن أكسونات ملتصقة ببعضها ولذلك يصبح قصير الطول. أما عن كيفية حدوث ذلك فى الخلية فهو غير معروف. أما فى بدائيات النواة مثل البكتيريا فإن mRNA لا يحتوى على مناطق إنترونات فى اثناء تكوينه ولذلك فإن طوله لا يقصر عند إرتباطه بالريبوسوم. يعتقد

أن البكتيريا كانت تكون mRNA به إنترونات ولكن أثناء التطور عبر ملايين السنين فقدت البكتيريا هذه الصفة وأصبح الآن mRNA البكتيرى خال من الإنترونات.

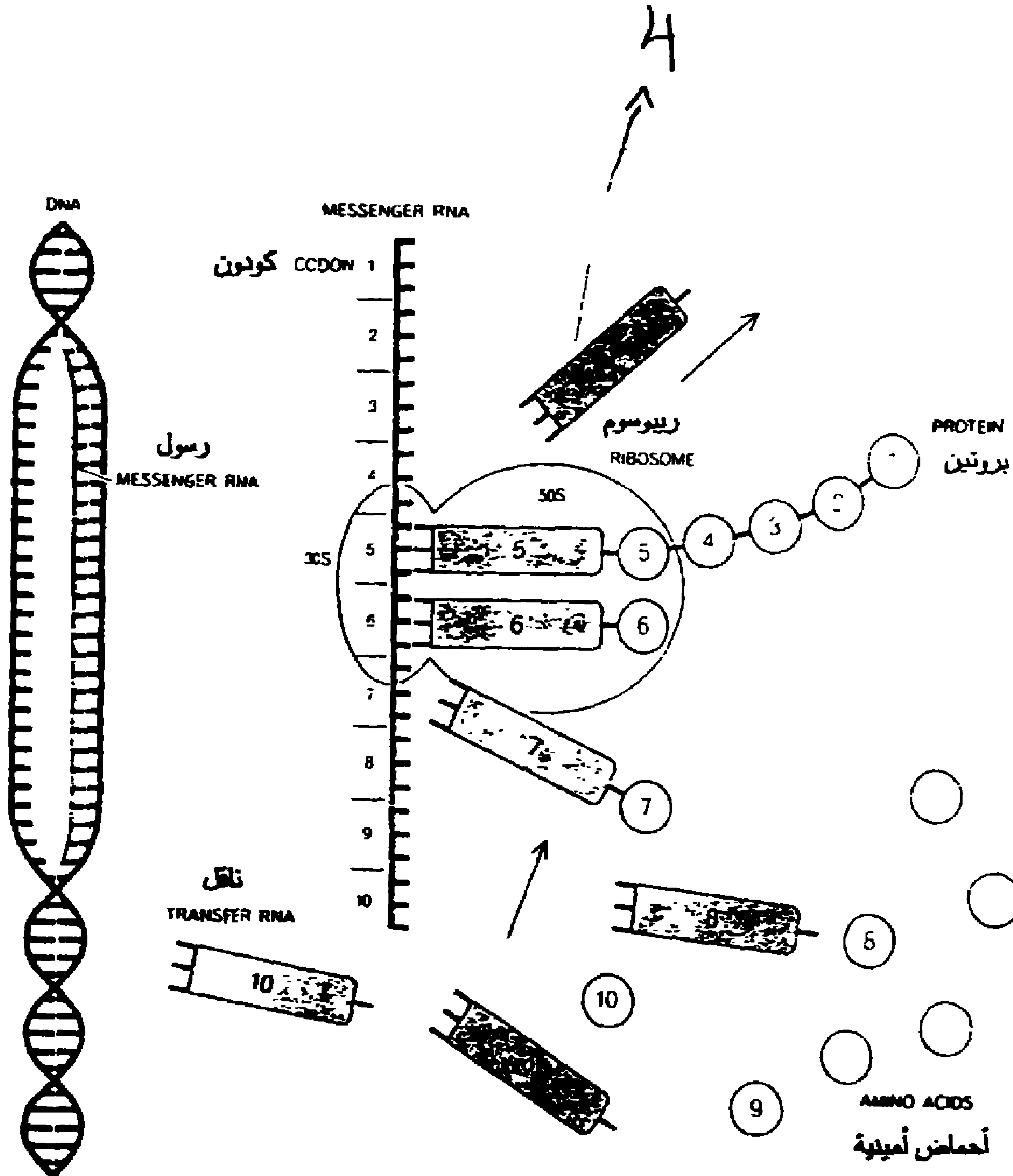
يوجد على الريبوسوم موقعان يمكن أن ترتبط بهما جزيئات tRNA. الموقع p على الريبوسوم يسمى موقع الببتيديل peptidyl والموقع A الى يليه يسمى موقع أمينوأسيل أو أمينوأكيل aminoacyl. ولذلك فإن فى البداية يكون كودون البدء AUG عند موقع الببتيديل. لكل حامض أمينى tRNA خاص به ويرتبط الحامض الأمينى فى قمم tRNA الخاص به بواسطة إنزيم aminoacyl tRNA synthetase. وحيث أنه يوجد عشرون حامض أمينى فإنه يوجد عشرون tRNA وعلى الأقل عشرون نوع من إنزيم tRNA synthetase حيث أنه على الأقل يوجد إنزيم خاص لكل حامض أمينى. وكل إنزيم قادر على التعرف على نوع tRNA الخاص به ويلتصق به ويقوم بربط الحامض الأمينى الخاص به بـ tRNA. الأحماض الأمينية المختلفة توجد حرة فى الخلية وذلك قبل إرتباطها بـ tRNA. وبعد ربط الحامض الأمينى بـ tRNA الخاص به فإن الإنزيم يتحرر ويصبح حر ويكرر عملية الربط مرة أخرى. يتداخل tRNA بما يحمله من حامض أمينى مع الريبوسوم وغير معروف حتى الآن كيفية حدوث وطبيعة التداخل. ولكن يوجد عدة تفسيرات لكيفية حدوث العملية ومنها أن tRNA المرتبط بالحامض الأمينى يتحرك ويستقر على المنطقة المخصصة له على mRNA المتداخل مع تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم وهى موقع أمينوأسيل فى الريبوسوم وبعد ذلك ترتبط تحت الوحدة الكبرى الحرة بتحت الوحدة الصغرى السابقة لتتكون وحدة الريبوسوم الكاملة. ولكى تحدث الخطوات ويتكامل الريبوسوم يحتاج إلى أنواع خاصة من البروتين وتسمى بعوامل البداية (البدء) initation factors (IF) وهى IF1 و IF2 و IF3. أول كودون فى mRNA هو AUG وتكون القواعد النيتروجينية متجهة لأعلى ثم تتزاوج بواسطة الروابط الإيدروجينية قواعد مقابل الكودون UAC لجزىء tRNA الخاص بالميثيونين مع كودون AUG وذلك فى موقع الببتيديل وبذلك يصبح الحامض الأمينى مثيونين methionine أو حامض أمينى فى سلسلة عديد الببتيد التى ستبنى. وأما عن عملية ربط ثان الأحماض الأمينية فى

سلسلة عديد الببتيد فإن tRNA الثانى يرتبط بحامض أمينى معين يرتبط مقابل الكودون الخاص به بالكودون التالى على جزىء mRNA وبالتالى يصبح الحامض الأمينى الذى يحمل جزىء tRNA الحامض الأمينى الثانى فى السلسلة. يحدث بعد ذلك تفاعل خاص لربطه الحامضين الأمينين ببعضهما بواسطة ببتيدية ويسمى تفاعل نقل الببتيديل peptidyl transferase reaction والإنزيم الاص بهذا التفاعل عبارة عن جزء من تحت وحدة الريبوسوم الكبيرة. بذلك يرتبط الحامض الأمينى الأول فى السلسلة وهو الميثيونين بالحامض الأمينى الثانى فى السلسلة على tRNA الاثنى ولذلك يصبح tRNA الأول والذى كان يحمل الحامض الأمينى ميثيونين فارغ. وفى هذه الأثناء يصبح tRNA الثانى فى موقع الببتيديل ويطلق عليه أيضاً موقع p,p site وفى نفسه هذه اللحظة يتحرك mRNA نفس المسافة.

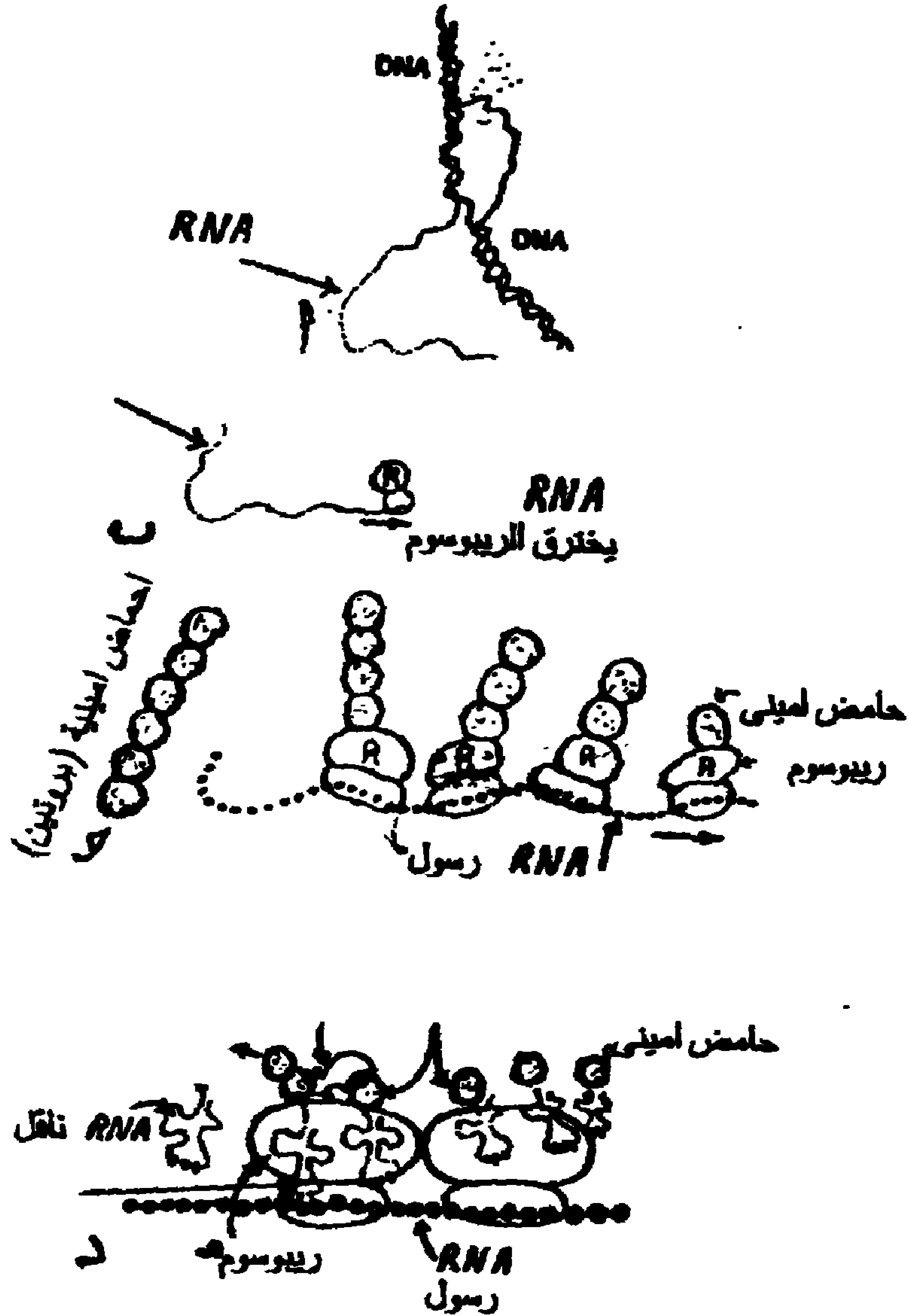
يوجد رأى أن الريبوسوم يتحرك فى عكس إتجاه بداية mRNA وفى كلا الحالتين يصبح الموقع أمينوأسيل ويطلق عليه أيضًا موقع A، A site فارغ ومستعد لإستقبال tRNA ثالث يحمل حامض أمينى ثالث ونتيجة لذلك يصبح tRNA الأول والذى كان يحمل الحامض الأمينى ميثيونين فارغ وحر ويترك الريبوسوم وهكذا تتكرر العملية وتزداد سلسلة الأحماض الأمينية فى الطول (الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها على هيئة سلسلة بروابط ببتيدية تسمى عديد الببتيد polyprptide) وهكذا تستمر العملية حتى نصل إلى أحد كودونات التوقف Stop وهى UGA و UAA و UAG وفى هذه الحالة تتوقف العملية ويتحرر عديد الببتيد من الريبوسوم. وتحتاج عملية تحرر عديد الببتيد إلى نوع من البروتين يسمى عامل التحرير حيث يرتبط بروتين عامل التحرير release factor (RF) بكودون التوقف فى المكان amino acyl (A) على الريبوسوم.

وبعد ذلك ينفصل تحت وحدتين الريبوسوم الصغيرة والكبيرة وعن mRNA وذلك فى وجود نوع خاص من البروتين يسمى عامل البداية initiation factor (IF3). توجد أعداد كبيرة من الريبوسومات متصلة بجزيىء واحد من mRNA وتعمل فى آن واحد ويسمى ذلك التركيب بعديد الريبوسومات polysomes أو polyribosomes حيث أنه عند بروز طرف mRNA من الريبوسوم ترتبط بتحت وحدة ريبوسوم أخرى

صغيرة تبدأ بدورها بناء عديد الببتيد وهكذا تتكرر العملية والإرتباط بالريبوسوم حتى يلتصق عدد كبير من الريبوسومات قد يصل مائة (شكل ٦٢-٦٥). يعتقد أن mRNA يخترق تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم ولكن الآن يفضـل الـرأى أن mRNA يوجد بين تحت الوحدتين الملتصقتين ببعضهما.



شكل ٦٢: خطوات تخليق البروتين. ويلاحظ أن RNA الناقـل مسـتطيل الشـكل للسهولة ولكنه يتكون من ساق وفروع ورأسين أو ثلاثة وقاعدة.



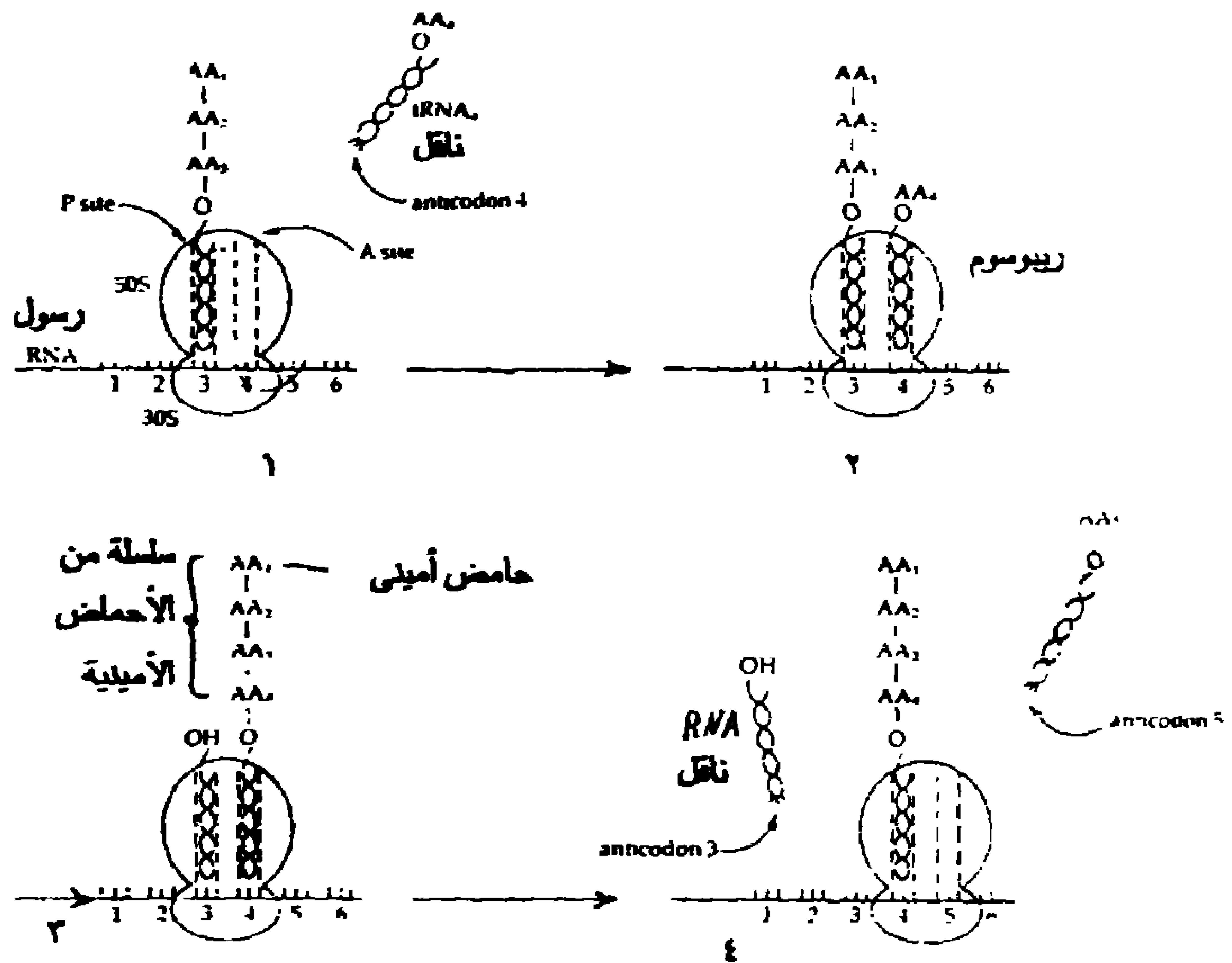
شكل ٦٣: خطوات تكوين بروتين الخلية.

(أ) تكوين RNA رسـول من DNA.

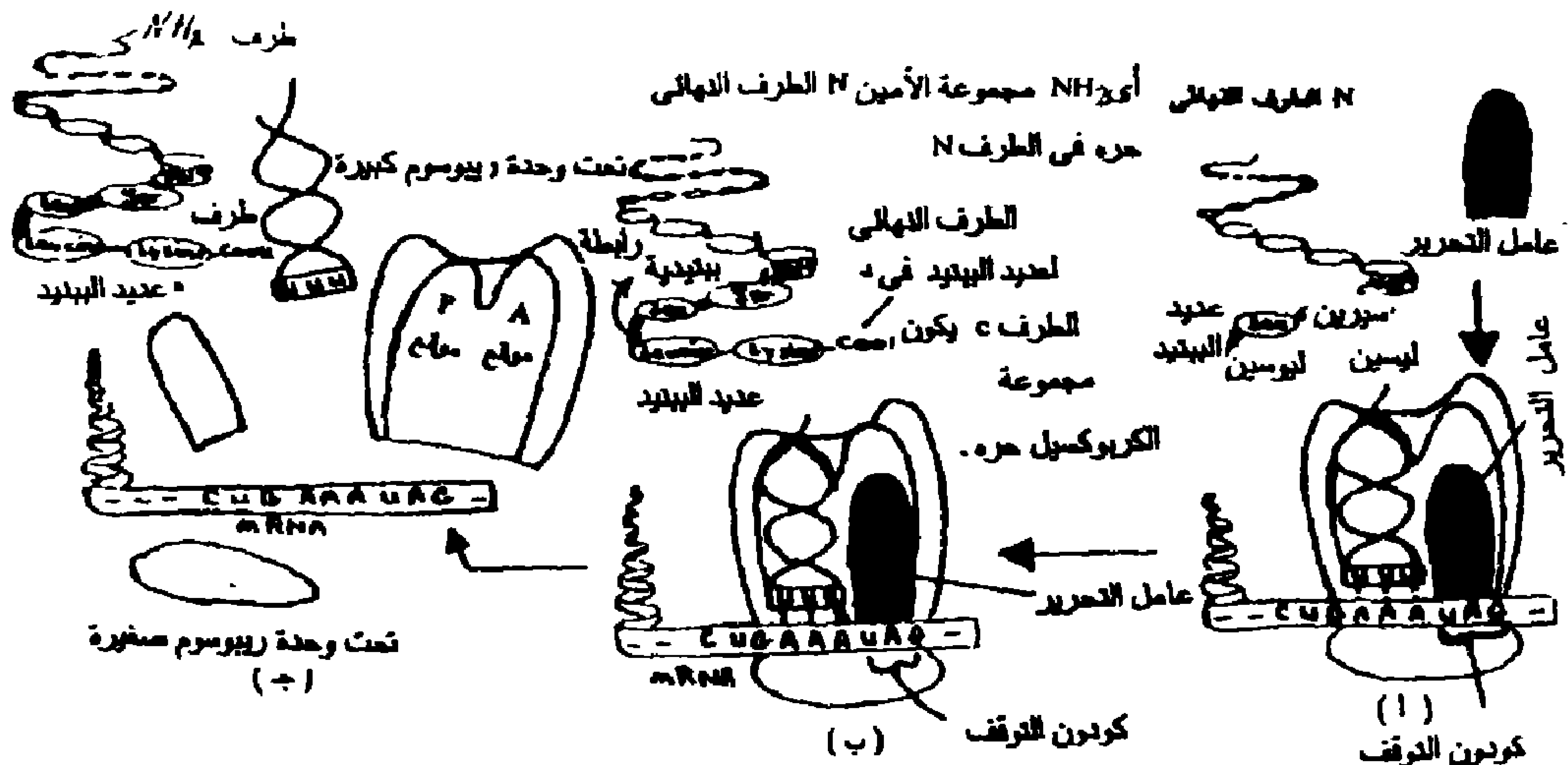
(ب) اختراق RNA رسـول للريبوسوم.

(جـ) عديد الريبوسومات يكون البروتين.

(د) منظر تفصيلى لعديد الريبوسومات وتكوين البروتين.



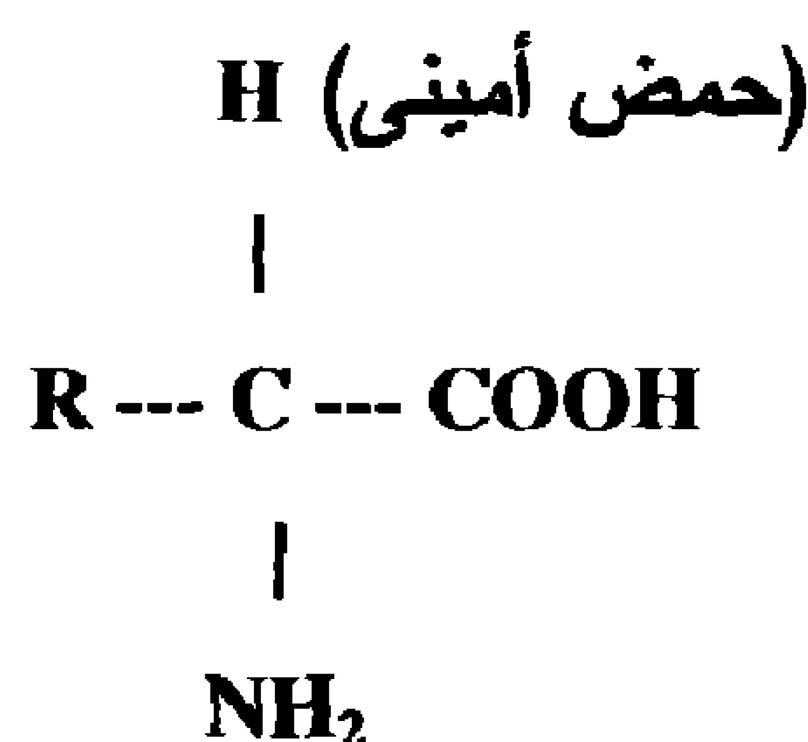
شكل ٦٤: خطوات تخليق البروتين بواسطة tRNA جزيئي تسلسلية



شكل ٦٥: إنهاء تكوين سلسلة عديد الببتيد. (أ) عندما يصل كودون إيقاف عند الموقع A يرتبط به عامل التحرير، (ب) ينتهي بناء عديد الببتيد ويتحرر، (ج) تستقل تحت وحدات الريبوسوم عن mRNA.

ملخص لخطوات تكوين البروتين وأنواعه

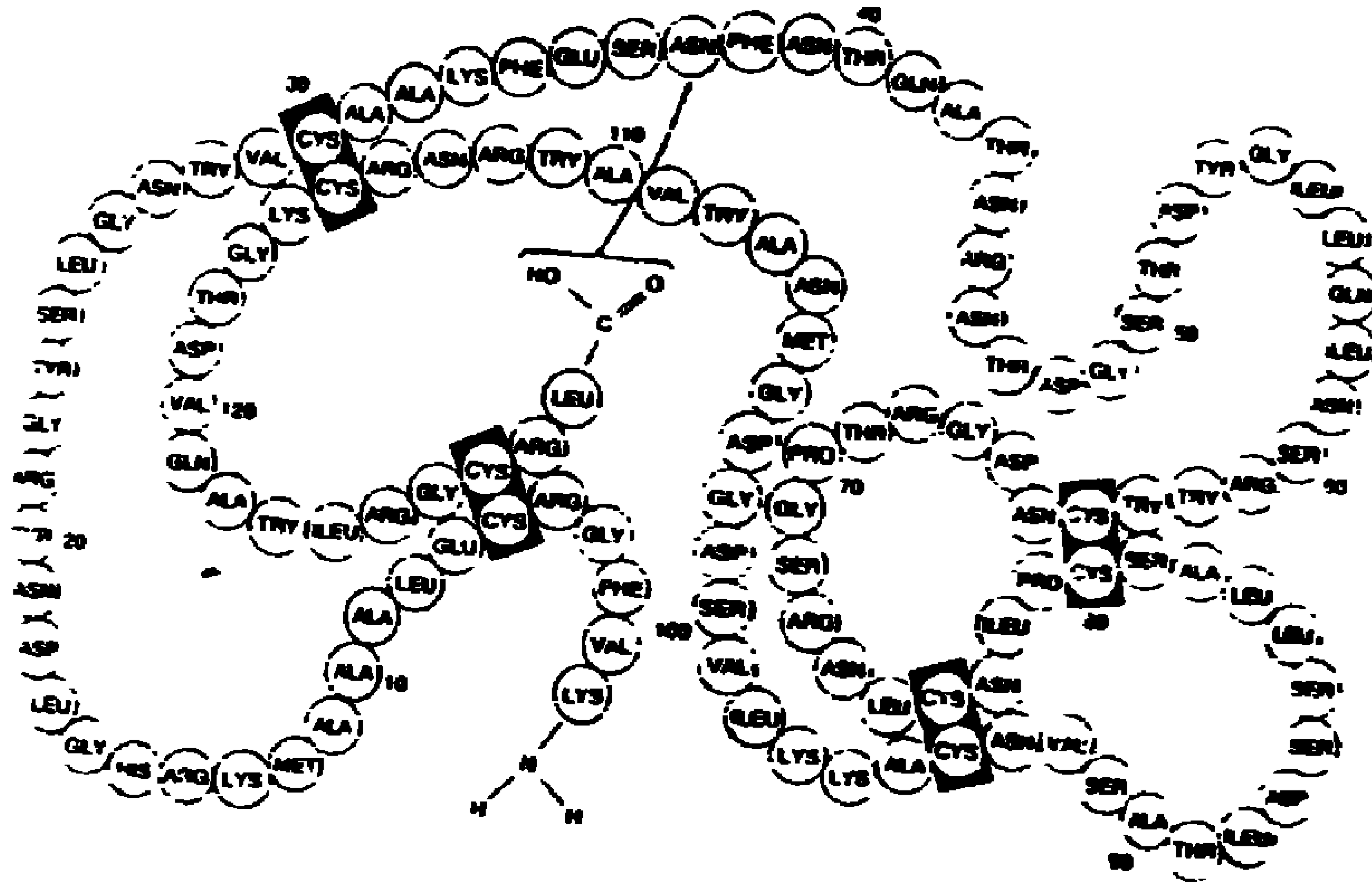
هناك خطة مشتركة لتكوين آلاف الأنواع من البروتينات التى توجد فى الأنظمة الحية، فهناك عشرون نوعاً من الوحدات البنائية للبروتين هى الأحماض الأمينية، وللأحماض الأمينية العشرين تركيب أساسى واحد حيث يحتوى كل حمض أمينى على مجموعة كربوكسيلية COOH ومجموعة أمينية NH_2 يرتبطان بأول ذرة كربون، كما توجد ذرة إيدروجين تعتبر المجموعة الثالثة التى ترتبط بنفس ذرة الكربون، وفيما عدا الحمض الأمينى جلايسين glycine الذى يحتوى على ذرة إيدروحين أخرى مرتبطة بذرة الكربون الأولى فإن الأحماض الأمينية التسعة عشرة الباقية تحتوى على مجموعة رابعة (R) تختلف بإختلاف الحمض الأمينى، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها فى وجود الإنزيمات الخاصة فى تفاعل نازع للماء بروابط ببتيدية peptide bonds لتكوين حامضين أمينيين مرتبطين ببعضهما ويسمى ثنائى الببتيد dipeptide ثم يرتبط حامض أمينى ثالث فيمسى ثلاثى الببتيد tripeptide ثم يرتبط حامض أمينى رابع فيمسى رباعى الببتيد وهكذا حتى تصبح السلسلة مكونة من أحماض أمينية عديدة فتسمى عديد الببتيدات polypeptide ويعتبر عديد الببتيدات بوليمر polymer.



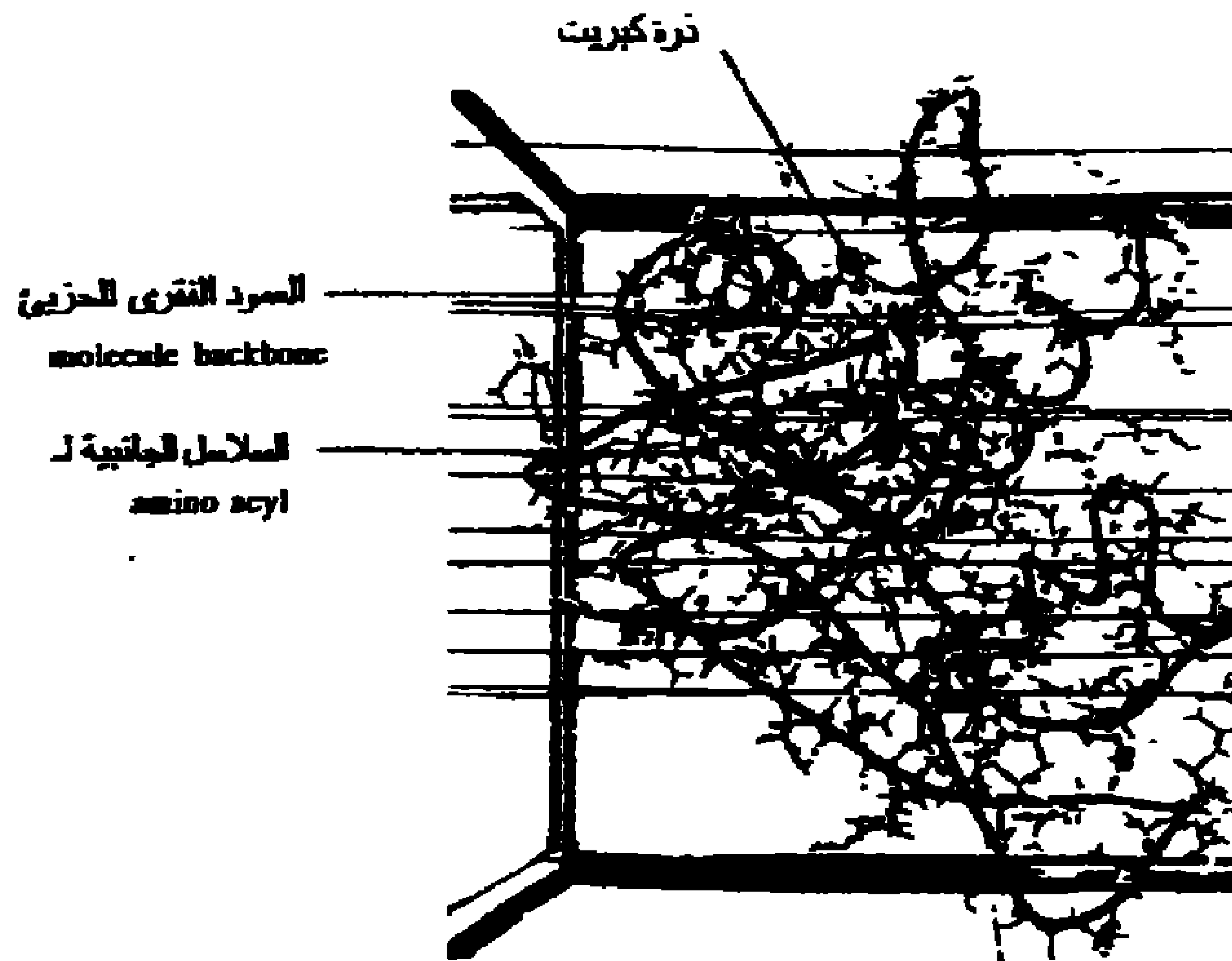
يوجد عديد الببتيد على هيئة شريط ويسمى التركيب الأولى primary structure ويكون فى هذه الحالة وهو لايزال متصل بالريبوسوم ثم يحدث بعد ذلك أن بعض أجزاء الشريط تلتف حلزونياً ويسمى هذا التركيب α-helix ويعتبر فى هذه الحالة أنه التركيب الثانوى seconday structure للبروتين. يمكن أن يحدث ذلك ولازال عديد

البيتيد متصل بالريبوسوم. ثم يحدث بعد ذلك التركيب الثالثى للبروتين tertiary structure حيث نجد أن جميع أجزاء الجزيء بما فيها 7-helix تلتف على بعضها لتكون بروتين له شكل ذوى ثلاثة أبعاد three dimensional shape وقد أمكن معرفة هذا التركيب بواسطة أشعة X. فى التركيب الثالثى وبعد حدوث الإلتفاف تتكون أنواع كثيرة من الروابط وأهمها disulfide bridges والروابط الكارهة للماء hydrophobic bonds والروابط الإيدروجينية hydrogen bonds. وتعمل هذه الروابط على الحفاظ على الإلتفاف وشكل البروتين. حيث أنه فى عدم وجود هذه الروابط يمكن أن ينفك الألتفاف فى جزيىء البروتين المميز للتركيب الأولى both the secondary and tertiary configuration of a protein are determined solely by its primary structure يمكن أن يتكون التركيب الرباعى للبروتين the quaternary structure of a protein وذلك بإتحاد أكثر من عديد الببتيد أى يكون أثنين أو ثلاثة أو أكثر ويكون لكل عديد الببتيد على حدة التركيب الإبتدائى والثانوى والثالثى الخاص به ومثال ذلك بروتين إنزيم جلوتاميك ديهيدروجينيز.

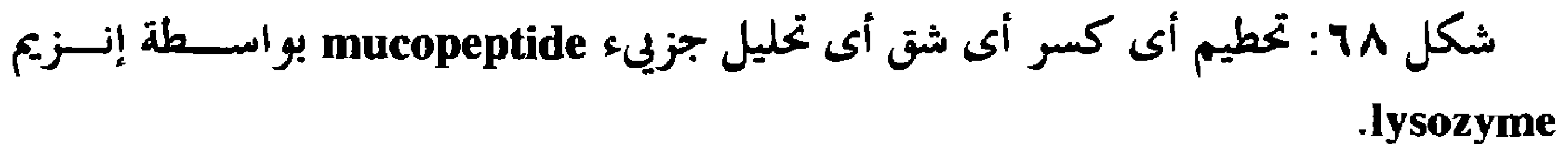
تختلف البروتينات فى ترتيب ونوع وعدد الأحماض الأمينية الداخلة فى التركيب الأولى وأن التركيب الأولى هو الذى يحدد مواصفات التركيب الثانوى والثالثى وأيضاً الرباعى إن وجد. يتضح أن الجينات تتحكم فى التركيب الأولى ولذلك فإن الجينات تتحكم فى تركيب البروتين (شكل ٦٦ و ٦٧) مثل ليروزيم lysozyme وريبونيوكلييز.



شكل ٦٦: التركيب الإبتدائى لبروتين ليزوزيم lysozyme بياض بيض الدجاج يوضح أربع روابط disulfide bridges بين السستثين cysteine. أسماء الأحماض الأمينية مختصرة بالحروف الأولى من كل حامض.



شكل ٦٧: جزىء بروتين ذو ثلاث أبعاد وهو عبارة عن إنزيم ribonuclease. العمود الفقرى للجزيء وهوسلسلة عديد الببتيدات polypeptide عبارة الخط الأسد الثقيل وأما عن السلاسل الجانبية لـــ amin acyl عبارة عن الخطوط الرفيعة وذرات الكبريت عبـــارة عن شكل كروى تكون أربعة disulfide bridges.



شكل ٦٨: تحطيم أى كسر أى شق أى تحليل جزيء mucopeptide بواسطة إنزيم lysozyme.

يوضح الشكل (٦٨) تكسير جزيء mucopeptide بواسطة ليزوزيم.

توجد أنواع كثيرة من البروتين فى الكائنات الحية ويكن تصنيفها إلى مجموعتين كما هى:

١ - البروتينات التركيبية:
Structural Proteins:

أى التى تدخل فى تراكيب محددة فى الكائن الحى مثل الأكتين والميوسين الذين يدخلان فى تركيب العضلات وغيرها من أعضاء الحركة، والكولاجين الذى يدخل فى تركيب الأنسجة الضامة، والكيراتين الذى يكون الأغطية الواقية كالجلد والشعر الحوافر والقرون والريش وغيرها.

أما البروتينات الهستونية فهى مجموعة محددة من البروتينات التركيبية توجد فى النواه، والهستونات بروتينات صغيرة تحتوى على قدر كبير من الحمضين الأمينيين القاعديين أرجنين Arginine وليسين Lysine، وتحمل المجموعة الجانبية (R) لهذين الحمضين الأمينيين عند الأس الهيدروجينى (pH) للخلية شحنات موجبة. وعلى ذلك فهى ترتبط بقوة بمجموعات الفوسفات الموجودة فى جزيء DNA والتى تحتوى على شحنات سالبة، وتوجد الهستونات بكميات ضخمة فى كروماتين أى خلية وفائدتها أنها تعمل كوسادة للكروماتين وبذلك تحافظ عليه وتحفظه حيث أن وجود الوسادة يقلل من الأضرار التى تحدث للكروماتين.

٢ - البروتينات التنظيمية

Regulatory Proteins:

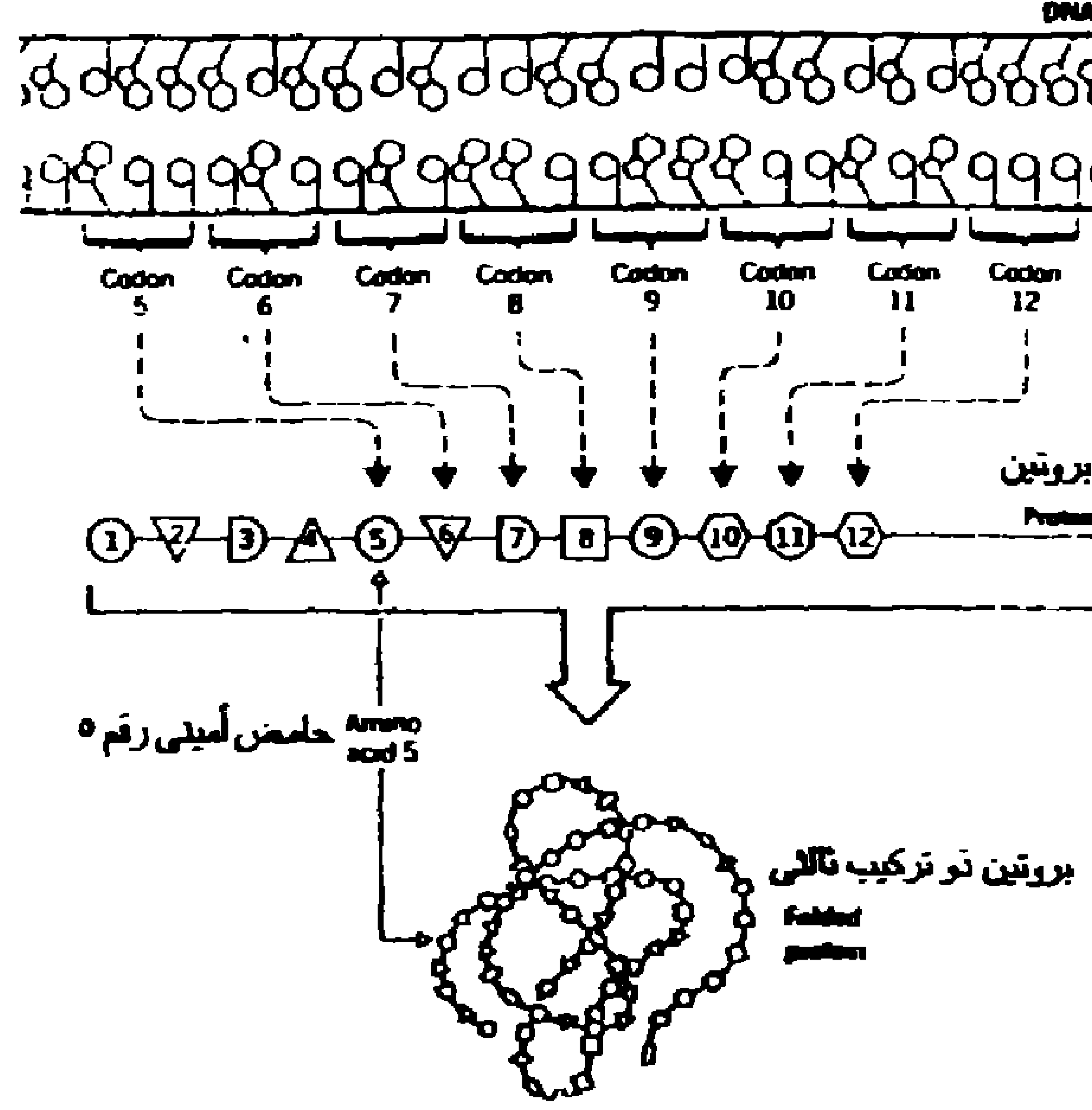
أى التى تنظم العديد من عمليات وأنشطة الكائن الحى، وهى تشمل الإنزيمات التى تقوم بالتفاعلات الكيميائية بالكائنات الحية والأجسام المضادة التى تعطى الجسم مناعة ضد الأجسام الغريبة والهرمونات وغير ذلك من المواد التى تمكن الكائنات الحية من الإستجابة للتغير المستمر فى البيئة الداخلية والخارجية.

وتعزى الفروق بين البروتينات المختلفة إلى الفروق فى أعداد وأنواع وترتيب الأحماض الأمينية فى عديد الببتيدات. كما تعزى إلى عدد عديد الببتيدات التى تدخل فى بناء البروتين بالإضافة إلى الروابط الإيدروجينية الضعيفة التى قد تعطى للجزيىء شكله المميز، وعملية تخليق البروتين عملية معقدة تتضمن تداخل العديد من الأنواع المختلفة من الجزيئات وخصاة الإنزيمات.

ملخص لعملية تخليق البروتين

لتخليق أى بروتين يتم نسخ الشفرة الوراثية له والموجودة على جزيىء DNA إلى جزيىء RNA الرسول messengerRNA (mRNA) الذى يحمل تلك الشفرة إلى الريبوسومات حيث يتم بناء هذا البروتين. وتحدد الشفرة الوراثية الموجودة على جزىء DNA وبالتالى على جزيىء mRNA ترتيب الأحماض الأمينية التى ستكون عديد الببتيد، إلا أن ((كلمة الشفرة)) فى mRNA لا تعرف بشكل مباشر على الحمض الأمينى المقابل ولكنها تحتاج إلى جزيىء موصل adaptor هو transfer (tRNA) رنا ناقل. وهناك جزىء tRNA خاص بكل حامض أمينى، ويترابط أحد طرفى هذا الجزيىء بالحمض الأمينى الخاص به، كما يوجد على جزء من tRNA تتابع للنيوكليوتيدات أى مقابل الكودون يتعرف على ويتزاوج مع تتابع للنيوكليوتيدات (كودون) على mRNA وعند قراءة شفرة mRNA من على الريبوسوم فإن جزيئات tRNA تصل بالتتابع وتعطى أحماضها الأمينية إلى سلسلة عديد الببتيد النامية.

وتستخدم جزيئات tRNA المرة بعد الأخرى فى نقل الأحماض الأمينية، كما أن جزيئات mRNA يمكن أن تترجم أكثر من مرة لتعطى العديد من نسخ عديد الببتيد الذى تحمله شفرته. ثم يتكون من عديد الببتيد جزيىء البروتين. ولذلك يتضح أن الجين أو الجينات تتحكم فى تخليق البروتين (شكل ٦٩).



شكل ٦٩: خطوات تخليق البروتين من DNA.

التثبيط والتوهين وتخلق الأحماض الأمينية والبروتين

لكى يتمكن مهندس الوراثة genetic engineer من تنظيم عملية إنتاج RNA يجب أن يتحكم فى كيفية البدء والإنتهاء فى عملية الإنتاج حيث أنه إذا لم يمكنه كيف ومن أين يبتدأ فستكون عملية إنتاج RNA مختلة وأيضاً إذا لم يمكنه كيف ومتى ينتهى من العملية فسيحدث إختلال فى إنتاج RNA. يمكن التحكم فى ذلك بواسطة طريقتين وهما المنع والتثبيط repression والتوهين attenuation وقد تم دراسة هاتين الطريقتين بالتفصيل فى البكتيريا. تم شرح طريقة المنع بالتفصيل فى الجزء السابق وفيما يلى طريقة شرح التوهين.

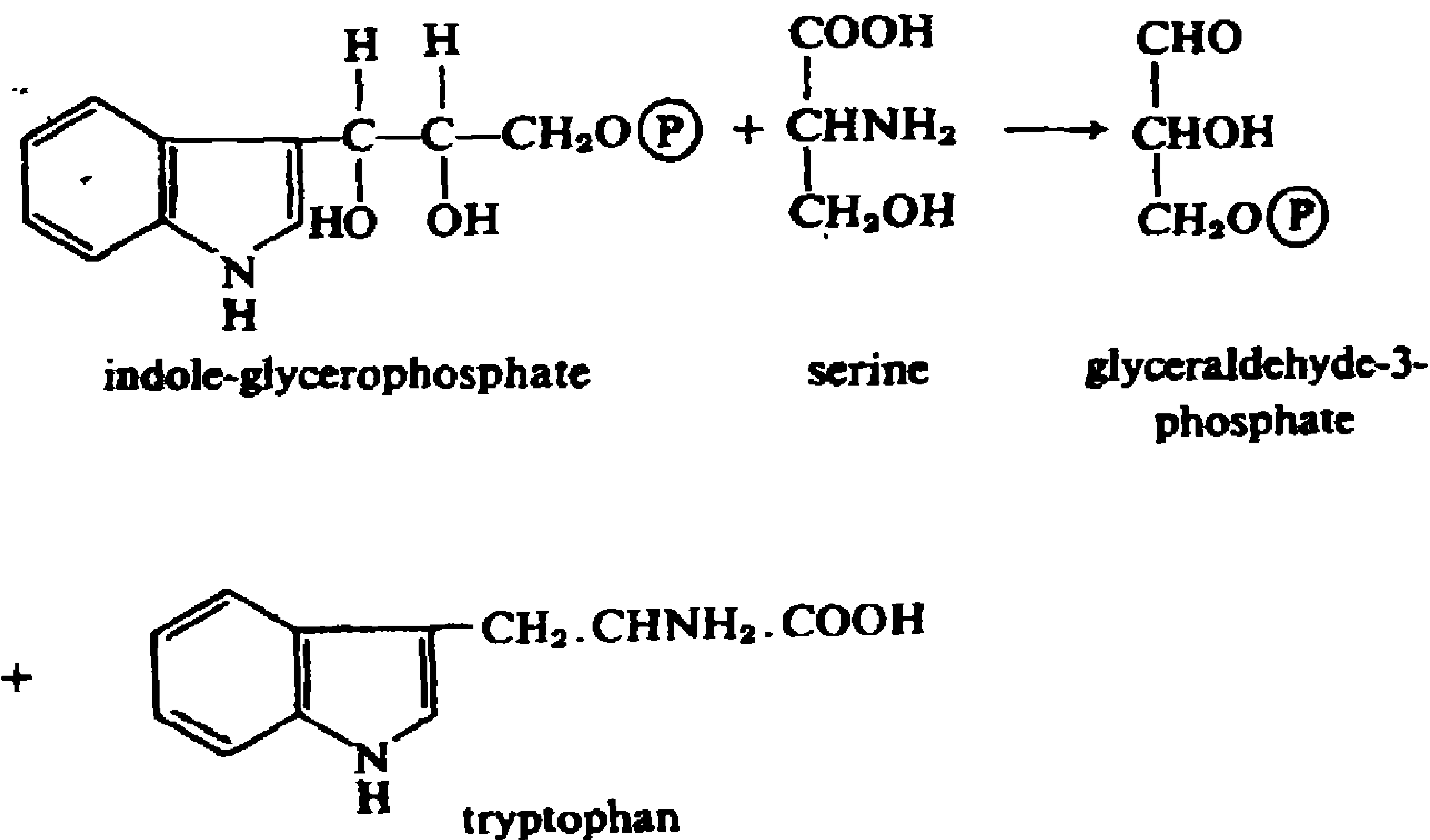
أما فى حالة التوهين attenuation فإنه يتكون شريط قصير من mRNA. درست هذه الحالة دراسة مستفيضة على الجينات التى تقوم بتخليق الأحماض الأمينية. حيث أنه من المعروف أن لابد من وجود توازن فى كمية الأحماض الأمينية فى الخلية وعددها عشرون وعند وجود حامض أمينى بتركيز عال فى الخلية فإن الخلية توقف إنتاج هذا الحامض لفترة وبذلك فإنها تدخر وتحفظ الطاقة اللازمة لإنتاج هذا الحامض الأمينى الزائد عن حاجة الخلية. أى أنه يوجد حفظ وتنظيم لطاقة الخلية المستعملة فى إنتاج الأحماض الأمينية. يحدث ذلك فى الخلية عن طريق عملية التوهين. ومثال ذلك حالة التوهين فى جينات الحامض الأمينى تربتوفان. حيث أن إنزيم RNA polymerase يبتدأ فى عمل mRNA على بعد مسافة محدودة من بداية أول جين فى الرسالة. ينتج عن ذلك ما يسمى RNA القائد leader RNA وهذا الأخير يتكون منه بروتين قصير قائد a short leader protein. ويوجد على RNA القائد كودونات تحتم وجود التربتوفان فى البروتين القائد. وفى منطقة القائد leader region (وهى الجزء من DNA الذى يبدأ بمنطقة نشاط RNA polymerase وينتهى عند بداية أول جين فى الرسالة) يوجد غشارة وقوف فعالة active stop signal تسمى الموهن attenuator. عند وجود تركيز عال من التربتوفان فإن الريبوسومات

تكون قادرة على تخليق البروتين القائد ونتيجة لـذلك فـإن منطقـة مـوهن الـ attenuator region of RNA-RNA تنطوى وتلتوى بطريقة معينة وتمنـع وتوقـف نشاط إنزيم RNA polymerase. وبذلك يتوقف تكوين البـروتين الخـاص بتكـوين وتخليق التربتوفان. ولكن فى وجود ندرة فى تركيز التربتوفان فإن حركة الريبوسوم تتأخر أو تتوقف عندما يصل إلى منطقة كودونات التربتوفان فى RNA القائد الـلازم لتكوين البروتين القائد. تأخير أو توقف الريبوسوم يمنع الموهن من تأثيره على وقف نشاط إنزيم RNA polymerase ولذلك ينشط هذا الإنزيم ويستمر فـى عملـه علـى جزيىء DNA ليكون رسالة كاملة entire message. ويتكون mRNA كامل يحمل كل مواصفات الجينات الداخلة فى تخليق البروتين اللازم لتكـوين الإنزيمـات اللازمـة لتخليق التربتوفان مثل إنزيم تربتوفان سنثيتيز tryptophan synthetase (شكل ٧٠). كل واحد من هذه الجينات له موقعه الخاص على mRNA وله مكان للبدايـة start site للربط بالريبوسومات خاص به. وهكذا فإن تركيز التربتوفان فى الخلية يـتحكم وينظم تخليق التربتوفان.

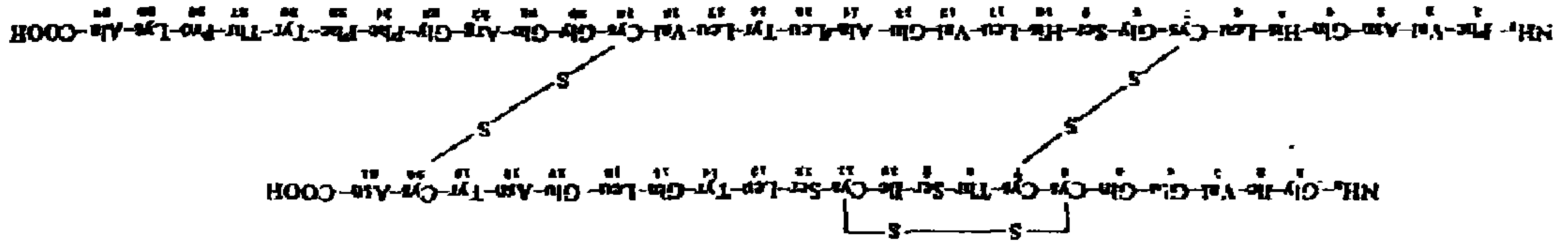
مما سبق يتضح أن المنع والتوهين ما طريقتان هامتان لكى تتحكم الخليـة فـى إنتاج مركبات لازمة لها وتمنع تكوين مركبات غير لازمة. ومثال لذلك فى الإنسان أو الحيوان أو النبات فإن الخلية تحتوى على جينات كثيرة بعض هذه الجينات يحتاجهـا الكائن الحى فى فترة من فترات حياته فقط لأنها تتحكم فى إنتـاج مركبـات معينـة مطلوبة فى فترة معينة بينما تكون هذه المركبات غير مطلوبة فى فترة أخـرى مـن الحياة. ولذلك يجب منع الجينات عن إنتاج هذه المركبات ويكـون ذلـك بـالمنع أو التوهين أو كليهما. ومن أمثلة ذلك الإنسان يمكن أن تنطبق عليه هذه القاعدة ففـى مرحلة البلوغ تتكون مركبات أو وحدات لا يكونها فى مرحلة الطفولة قد تكون هـذه هورومونات معينة أو إنزيمات أو مركبات معينة ففى مرحلة البلـوغ فـى الـذكور تتكون الحيوانات المنوية التى لا تتكون بالطبع فى مرحلة الطفولة أو الصبى.

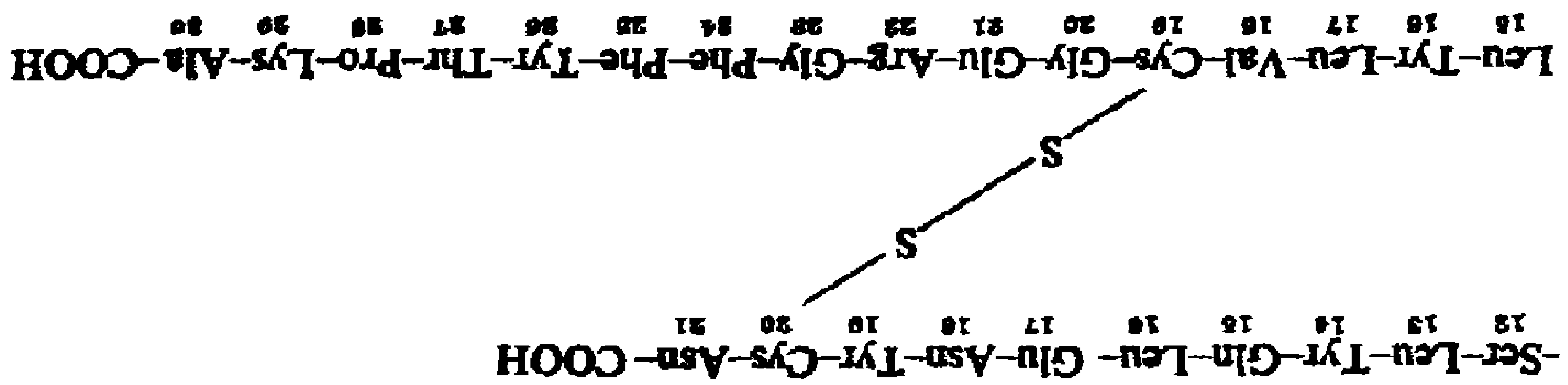
يعتبر نقل جينات وصفة تخليق الأنسولين (شكل ٧١) من الإنسان إلى البكتيريـا

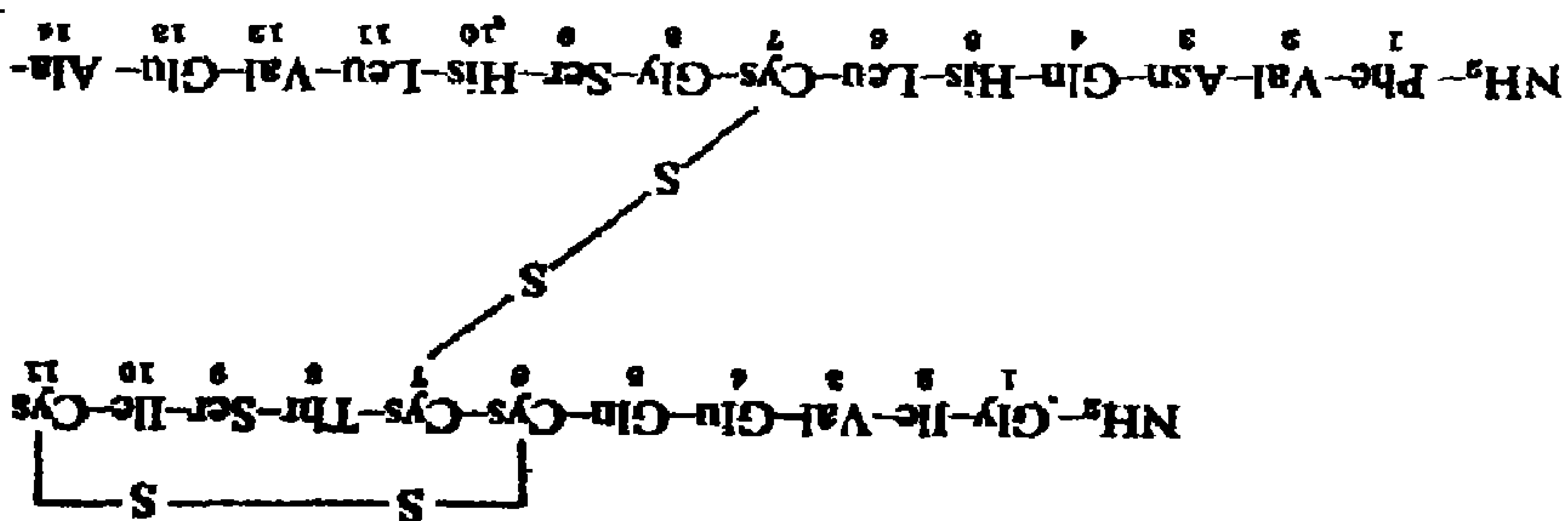
من الإنجازات العظيمة للهندسة الوراثية. ولكن بعد نقل الجينات إلى البكتيريا كيف تتحكم فى تنشط أو منع هذه الجينات من أداء وظيفتها. حيث أنه بعد نقل هذه الجينات إلى البكتيريا فإننا نحتاج أولاً أن نمنع البكتيريا من إنتاج الأنسولين لكى تتكاثر بكفاءة عالية وتنتج أعداد هائلة من الخلايا البكتيرية وبعد ذلك ننشط هذه الأعداد الهائلة من الخلايا البكتيرية لإنتاج بروتين الأنسولين وبذلك يمكن الحصول على كميات كبيرة من الأنسولين وتصبح الطريقة إقتصادية. يمكن التحكم فى ذلك بواسطة المنع. حيث يوضع الجين أو الجينات الخاصة بإنتاج الأنسولين فى DNA البكتيرى مباشرة بعد منطقة المانع. وعن طريق إزالة المانع أو وضعه فى مكانه يمكن التحكم فى إنتاج الأنسولين أو منعه وهكذا يمكن التحكم فى إنتاج الأنسولين أو منعه فى الخلية البكتيرية تبعاً للحاجة وتشابه هذه الحالة تحليل المركبات الغذائية المتوفرة أو الغير متوفرة داخل الخلية البكتيرية والتى تتحكم فى إزالة أو ربط المانع.



شكل ٧٠: عمل إنزيم tryptophon synthetase فى تخليق التربتوفان.







شكل ٧١: تركيب جزيء الإنسولين من بدائي الإنسـولين proinsulin في الخنزيـر بواسطة نشاط الإنزيمات المحللة للبروتين proteolysis.

الباب الخامس

توطين الجين

توطين الجين

Gene Cloning

(نقله وتسكينه وزيادته فى العدد أى إكثاره أى إستنساخه)

من الطرق الهامة فى الهندسة الوراثيـة تـوطين الجـين gene cloning ويمكـن تلخيص توطين الجين فيما يأتى:

١ – جزء من جزيىء دنا يحتوى على جين مطلوب عزله ونقله، ويتم إدخال هذا الجين فى جزيىء دنا حلقى circular DNA molecule يسمى الناقل الوسيط vector. ينتج عن ذلك كيميرا chimaera أى جزيىء دنـا معـاد صـياغته recombinant DNA molecule.

٢ – يعمل الناقل الوسيط كوحدة متحركة vehicle حيث يقوم بنقل الجين المرغوب نقله إلى خلية العائل host cell. عادة تكون خلية العائل بكتيريا ولكـن قـد تكون عوائل أخرى مثل الخميرة.

٣ – يتكاثر الناقل الوسيط فى داخل خلية العائل منتجاً عديد من الوحدات المتماثلة أى عديد من النسخ copies وبذلك تنتج تنتج عديد من النسخ الحاملة للجين المطلوب.

٤ – عند تكاثر خلية العائل فإنه ينتقل إلى النسل جزيـىء دنـا معـاد صـياغته وبالتالى فإن إنقسامات عديدة للناقل الوسيط يتم حدوثها.

٥ – بعد عديد من إنقسامات خلية العائل فإنه يتكون مستعمرة colony أى وحدات متماثلة تماماً clone. كل خلية فى المستعمرة تحتوى على واحد أو عديد من نسخ جزيىء دنا معاد صياغته. وفى هـذه الحالة فإن الجين تحت الدراسـة أى المطلوب نقله بواسطة جزيىء دنا المعاد صياغته يطلق عليه تم توطينه to be cloned. زيادة الجين المطلوب فى العدد يسمى إستنساخ.

يفصل المؤلف كلمة توطين الجين gene cloning عن كلمة الإستنسـاخ حيـث أن

الجين المطلوب يتم عزله ونقله وإكثاره وزيادته عددياً أى تكراره. حيث أن عملية التوطين فى الإنسان هى نقله مجموعة قليلة من مكان إلى آخر وفى المكان الأخير تستقر المجموعة وتتزاوج وتتناسل لتكون عشيرة كبيرة أو كبيرة جداً فى مكان جديد مثلما يحدث فى توطين البدو فى مكان معين أو توطين بعض المزارعين من الدلتا إلى الأراض المستصلحة حديثاً نسبياً وأيضاً نشوء أستراليا وأمريكا. فهذا التوطين يماثل توطين الجين من حيث نقله وإستقراره فى عائل جديد ثم زيادته فى العدد بدرجة كبيرة. عامة يفضل المؤلف كلمة توطين الجين عن كلمة إستنساخ الجين.

إستخلاص وتنقية دنا من الخلايا الحية

Purification of DNA From Living Cells

يحتاج مهندس الوراثة إلى تحضير دنا وذلك بإستخلاصه وتنقيته من الخلايا الحية. أولاً يحتاج تحضير دنا الخلية وهذا الدنا المستخلص من الخلية يحتوى على الجينات المطلوب توطينها. ولذلك يستخلص هذا الدنا من خلية نبات أو بكتيريا أو حيوان أو إنسان ألخ المطلوب دراسة جيناتها. ثانياً تنقية البلازميدات من الخلية وذلك بفصل البلازميدات من مزارع البكتيريا وتعبر خطوة لتنقية البلازميدات من دنا الكلى للخلية. أى أولاً يتم تنقية دنا الخلية الكلى ثم يتم فصل دنا البلازميدات من دنا الخلية الكلى أى يتم فصل دنا البلازميدات من دنا الكروموسومى. ثالثاً أحياناً يحتاج مهندس الوراثة إلى تنقية الفاج. عادة يكون تنقية دنا الفاج بنزع الغلاف البروتينى capsid ولكن أحياناً يتم تنقية الفاج من خلايا البكتيريا وهذا نادراً ما يحدث. وهذه الحالة النادرة مثل حالة M13 ذو الخيطين أى الشريطين ds replicative form.

أولاً – تنقية دنا الخلية الكلى

Preparation of Total Cell DNA

لتحضير دنا الخلية الكلى من الإنسان أو الحيوان أو النبات يكون أساساً واحد

ولكن مع إختلافات بسيطة أو متوسطة فى كل حالة. وحيث أن البكتيريا تستعمل بكثرة فى هذا الصدد فسيتم شرح كيفية إستخلاص دنا من البكتيريا.

١ - تنمية البكتيريا على بيئات خاصة ثم يتم فصلها عن البيئة وتجميعها.

يمكن تنمية البكتيريا على بيئات خاصة عديدة أهمها بيئة الآجار المغذى nutrient agar أو بيئة المرق المغذى nutrient broth. حيث أن بيئة الآجار تعتبر شبه صلبة لإحتوائها على الآجار أما بيئة المرق المغذى فإنها سائلة لعدم إحتوائها على الآجار. يشترط فى تركيب البيئة ما يأتى:

أ – تحتوى على مصدر للكربون مثل السكروز أو الجلوكوز.

ب – تحتوى على مصدر للأزوت مثل النترات.

جـ – تحتوى على أملاح وهى مصدر للعناصر المغذية الضرورية.

د – تحتوى على مصدر للأحماض الأمينية مثل الببتون أو التريبتون.

هـ – تحتوى على مصدر للفيتامينات مثل الثيامين ومثل مستخلص الخميرة.

يجب أن يكون للبيئة pH معينة مناسبة لنمو البكتيريا. يتم تنمية البكتيريا على أحد البيئات المناسبة فى درجة حرارة مناسبة، يمكن أيضاً وضع الدوارق المخروطية النامية عليها البكتيريا على هزاز shaker وتغذيتها بالهواء وذلك على سرعة ١٥٠-٢٥٠ r.p.m يتم جمع الخلايا البكتيرية من الدوارق المخروطية وذلك بترسيبها على هيئة راسب فى قاع أنبوبة جهاز الطرد المركزى.

٢ - تحضير مستخلص الخلية:

Preparation of cell extract:

لتحضير مستخلص الخلية لابد من فصل جدار الخلية عن البروتوبلازم. يمكن كسر جدار خلية البكتيريا بطرق عديدة منها طرق ميكانيكية وطرق كيماوية. لكن المعتاد إستعمال الطرق الكيماوية فى هذا الصدد. يتم تكسير جدار الخلية بواسطة إنزيم lysozyme أو بواسطة ethylene diaminetetra aetate (EDTA) أو كليهما.

يعتبر الليزوزيم إنزيم موجود فى بياض البيض وفى الدموع واللعاب وهو يسبب هضم جدار الخلية المسئول عن صلابة الخلية. يسبب EDTA خلب أى إزالة أيونات المغنيسيوم اللازمة لحفظ تركيب جدار الخلية كما يسبب أيضاً تثبيط إنزيمات الخلية المحللة لدنا. فى بعض الأحيان تكون إحدى هاتين المعاملتين تكون كافيتان لطراوة جدار الخلية وإنبثاق وخروج البروتوبلازم.

ولكن عادة تحتاج إلى مركب إضافى وهو منظف detergent مثل sodium (SDS) dodecyl sulphate. تساعد المنظفات فى تحليل الخلايا بإزالة الدهون وبذلك تسبب إنفجار غشاء الخلية. يتم فصل البروتوبلازم عن الجدار بواسطة الطرد المركزى المناسب.

٣ - تنقية دنا مستخلص الخلية

Purification of DNA from cell extract

يتكون مستخلص الخلايا من بروتين ورنا ودنا أساساً ولذلك لابد من إزالة البروتين ورنا من المستخلص. الطريقة المثلى لإزالة البروتين من المستخلص هو إضافة الفينول أو مخلوط من الفينول والكلوروفورم بنسبة ١:١ هذه المذيبات العضوية ترسب البروتين ولكنها تترك الأحماض النووية رنا ودنا كما فى المحلول المائى. يتم فصل البروتين عن الأحماض النووية بالطرد المركزى حيث سيرسب البروتين وتبقى الأحماض النووية فى المحلول المائى وحيث يمكن أخذ الأخير بماصة. أحياناً تكون كمية البروتين كبيرة فى الخلية وفى هذه الحالة لابد من معاملة البروتوبلازم بواسطة إنزيمات بروتينير protease لتحليل البروتين ثم إضافة الفينول ثم الطرد المركزى.

بعض أنواع رنا خاصة رنا رسول يمكن أن تزال بالمعاملة بالفينول ولكن الغالبية العظمى تبقى فى المحلول المائى ولذلك فإن أفضل طريقة لذلك هو إزالة رنا بواسطة إنزيم ريبونيوكلييز RNase.

٤- تركيز عينات دنا

Concentration of DNA sample:

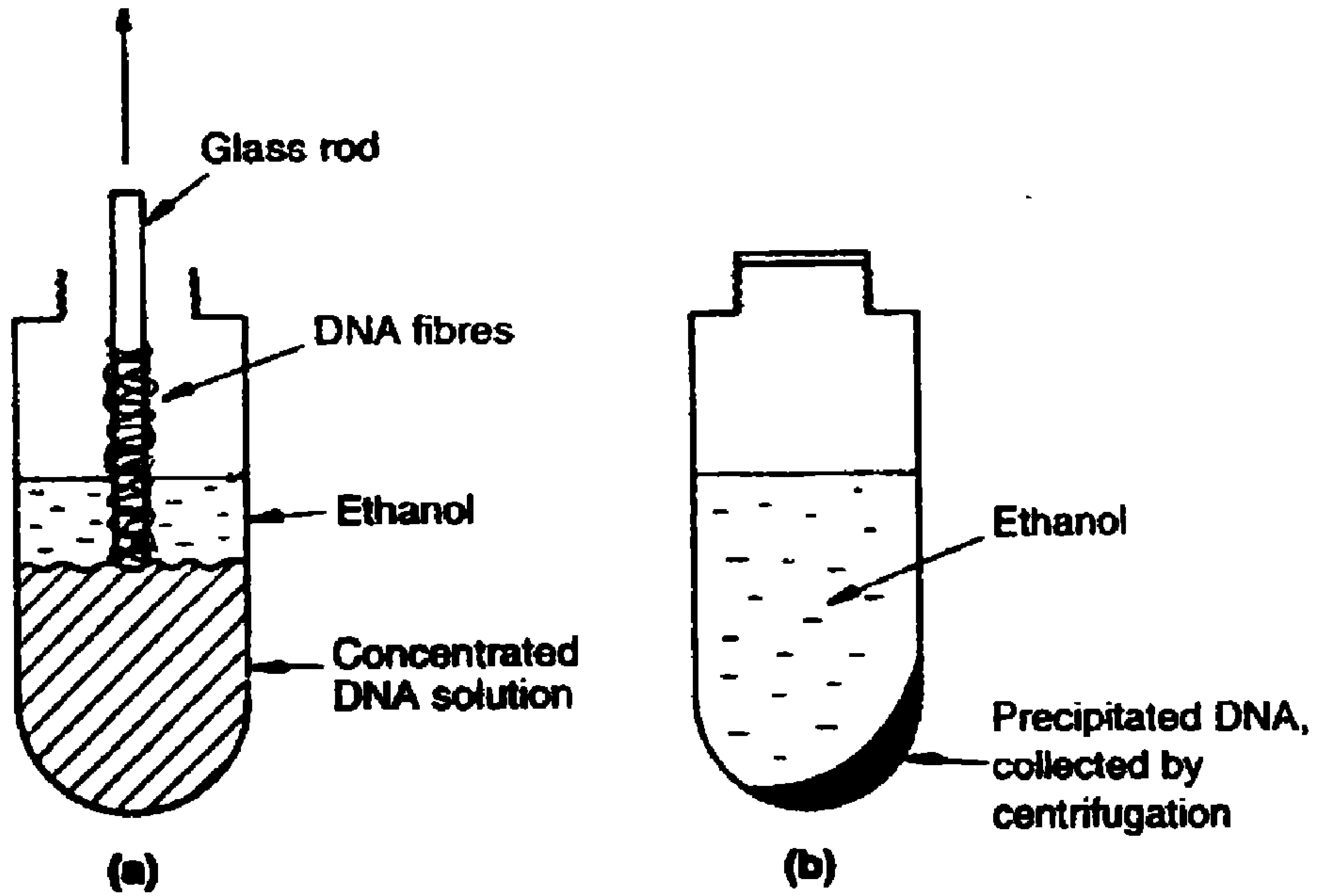
أحياناً كثيرة يكون دنا الناتج مركز بدرجة كبيرة ولكن أحياناً أخرى يكون في محلول مائي ويجب تركيزه. ومن أهم هذه الطرق هى الترسيب بكحول الإيثيل. في وجود ملح مثل كلوريد صوديوم أى فى وجود كاتيون أحادى مثل الصوديوم ودرجة حرارة -٢٠ْم أو أقل وكحول إيثيل مطلق يحدث ترسيب دنا. فى حالة محلول دنا الغليظ فإن الإيثانول يطفو على السطح ويبقى دنا فى القاع ويمكن إدخال قضيب زجاجى على السطح الفاصل بين الإيثانول ودنا وسحب القضيب. يتم تجمع دنا عليه ويتم الشد وخروج دنا على هيئة خيط (شكل ٧٢). توجد طريقة أخرى لفصل دنا فى المحلول المخفف وهى خلط الإيثانول مع دنا ثم الفصل بوساطة الطرد المركزى وبالطبع سيرسب دنا.

٥- قياس تركيز دنا

Measurement of DNA concentration:

يمكن قياسه بسهولة بجهاز تحليل الألوان ذو الأشعة فوق البنفسجية ultra violet spectrophotometer. يتم قياس تركيز دنا عند طول موجة ٢٦٠ نانومتر حيث يحدث أقصى إمتصاص لهذه الأشعة عند هذا الطول بواسطة دنا. عادة درجة الإمتصاص absorbance الواحدة (A260) أى درجة تساوى وجود ٥٠ ميكروجرام من ds DNA دنا ثنائى الشريط أى ثنائى الخيط أو الحلزون.

يمكن أيضاً إستعمال الأشعة الفوق بنفسجية فى الحكم على نقاوة حيث تكون النسبة للإمتصاص على طولى موجة مختلفين هما ٢٦٠، ٢٨٠ نانومتر A260/A280 تكون النسبة ١,٨ للنقى ولكن النسبة أقل من ذلك فى حالة التحضير الملوث بالفينول أو البروتين أو كليهما.



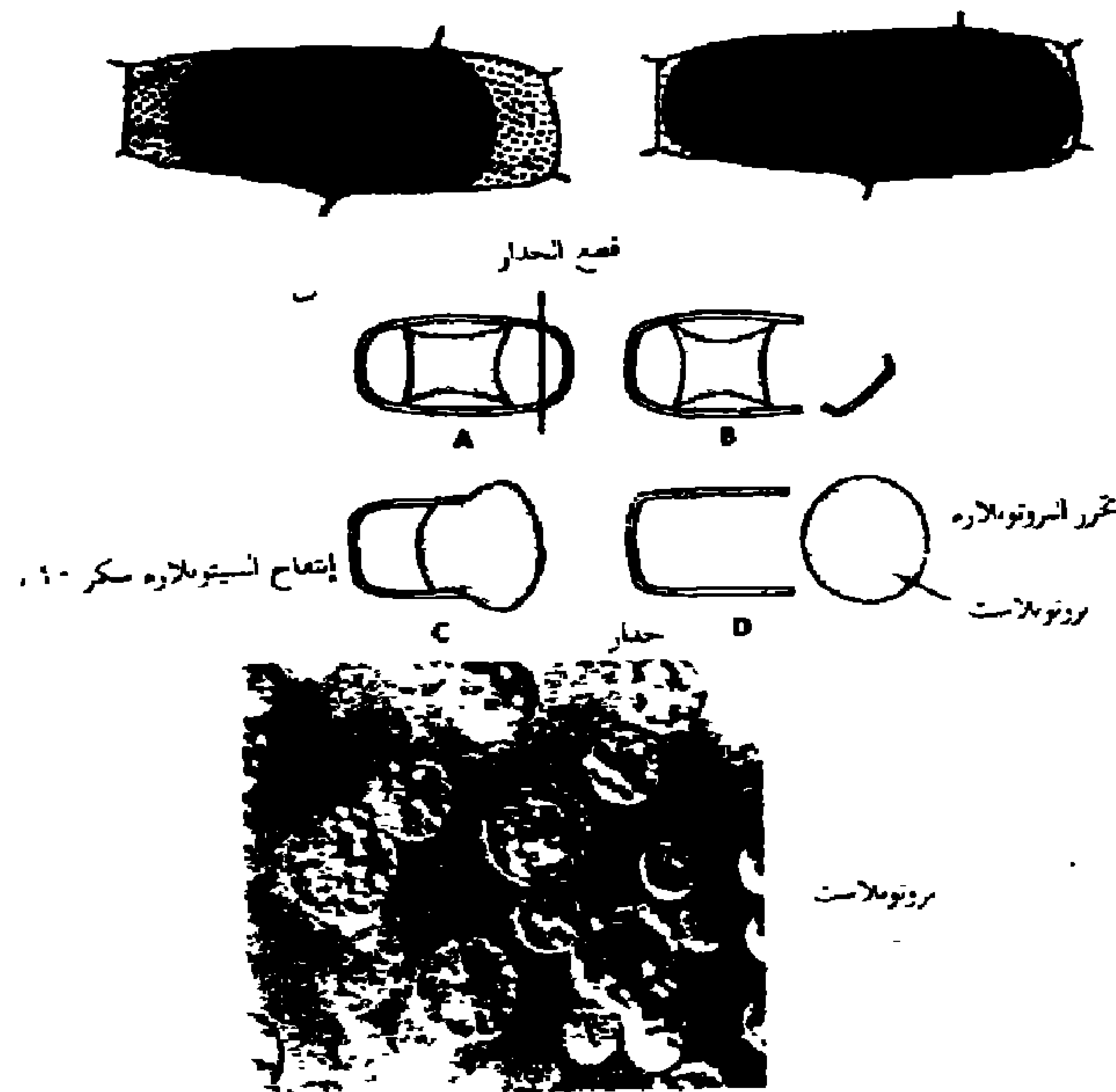
شكل ٧٢: جمع دنا بواسطة الترسيب بالإيثانول:
(a) يتم وضع طبقة من كحول الإيثانول المطلق على قمة محلول مركز من دنا. أليـاف دنا يمكن سحبها بواسطة قضيب زجاجي.
(b) فى حالة المحاليل الأقل تركيز من دنا (منخفضة التركيز) يضاف الإيثـانول بنسـبة ٢,٥ جم كحول مطلق إلى ١ حجم محلول دنا ثم يتم ترسيب دنا بواسطة الطـرد المركزى.

٦ - تحضيرات أخرى خلاف البكتيريا

Preparation of total cell DNA from organisms other than bacteia

قد يكون إستخلاص دنا من خلية نبات أو خلية حيوان أو خلية إنسـان وتختلـف الطرق المستعملة فى ذلك نسبياً عما سبق. مثال ذلك أن خلية الحيوان والإنسان ليس لها جدار خلوى ويمكن تحليلها بسهولة جداً دون إحتياج للمركبات السابق ذكرها فى البكتيريا ويكفى معاملتها فقط بمنظف detergent. والعكس صحيح فى خلايا النبـات حيث أن لها جدار خلوى صلب ولكن يختلف فى تركيبه عن الجـدار الخلـوى فـى البكتيريا ولذلك لا يصلح الليزوزيم فى خلايا النبات ويمكن أن يسـتعمل بـدلاً منـه

مخلوط من إنزيمات محللة للسيليلوز والمركبات البكتينية a mixture of cellulolytic and pecteolytic enzymes. ويمكن أن تباع تجارياً بأسماء عديدة. يمكن إستعمال خليط من الإنزيمات المحللة للسيليلوز. يمكن أيضاً عزل البروتوبلاست عن جدار الخلية بطريقة أخرى غير الإنزيمات وذلك بعمل بلزمة مبتدئة للخلايا بواسطة محلول مناسب مثل المانيتول mannitol أو السربتول sorbitol بتركيز مناسب حوالى ١١-١٣% وعند إبتعاد البروتوبلازم عن جدار الخلية يتم قطع الجدار بواسطة موس حاد بواسطة بينوكلر أو بإستعمال موس موجود فى جزء يشبه العدسة المكبرة micromanipulator وبذلك يمكن فصل جزء من الجدار تماماً ثم ينتفخ البروتوبلاست ويتحرر من الجدار وبذلك يصبح البروتوبلاست حر (شكل ٧٣). لا تصلح هذه الطريقة إلا فى الخلايا كبيرة الحجم مثل خلايا بشرة بصلة البصل وغيرها.



شكل ٧٣: خطوات فصل البروتوبلاست من الجدار بطريقة البلزمة المبتدئة (فصل ميكانيكى) فى خلية من نبات البصل.

(أ) خلية بها بلزمة مبتدئة.

(ب) خطوات فصل البروتوبلاست (A, B, C, D).

فى أثناء إجراء عملية البلزمة وقطع الجدار وأثناء تحــرر البروتوبلاســت مــن الجدار تتكون حويصلات حيث ينبعج غشاء الإكتوبلاست للداخل مكونــاً حويصــلات صغيرة وهذه الحويصلات تنفصل عن غشاء الإكتوبلاست وتصبح موجــودة بــداخل الخلية ويوجد نوعين من الحويصلات هما:

Plasmolytic vesicles وهى التى تتكون أثناء حدوث عملية البلزمة المبتدئة.

Pinocytotic vesicles وهى تتــكون فى أثناء الخطــوات التــى تــلى ذلك.

مما سبق يتضح أن البروتوبلاست العارى عديم الجدار يمكن أن يتميز بخاصــية الخلية الحيوانية وهى تكوين الحويصلات وإنتقالها إلى داخل الخلية.

كما وجد أيضاً أن للبروتوبلاست العارى للخلايا يمكنه أن يلتقم جزيئات صلبة مثل ferritin و thorium وجزيئات الفيرس وتصبح هــذه الجزيئــات موجــودة بــداخل الخلايا.

وقد يمكن تطبيق هذه الظاهرة إقتصادياً حيث تجرى محاولات لجعل الخلايا تلــتقم بكتيريا العقد الجذرية وبذلك تثبت هذه الخلايا النيتروجين الجوى وبذلك تتمتع هــذه الخلايا بصفة موجودة فقط فى نباتات العائلة البقولية دون نباتات العائلات الأخــرى. لكن حتى ألان لم ينجح أحد فى عمل ذلك. يمكن الآن عمل هذه الحويصلات صــناعياً من lipoproteins.

يختلف البروتوبلاست فى شكله وحجمه ولونه تبعاً لنوع الخلايا المــأخوذة منهــا ففى حالة الخلايا الكلورانشيمية يكون البروتوبلاست لونه مخضر وبه فجوة عصارية واضحة، وفى حالة الخلايا الملونة أو بتلات الأزهار فإن البروتوبلاست يكون ملون، وفى حالة خلايا البشرة فإن البروتوبلاست يكــون غيــر مخضــر ويختلــف حجــم البروتوبلاست بإختلاف نوع الخلايا المأخوذ منها.

ومما هو جدير بالذكر أنه فى كثير من الحالات فى مزارع البروتوبلاســت يكــون البروتوبلاست شديد الدرة على تكوين جدار خلوى ويتكون هذا الجدار بسرعة كبيرة

وهذه أحد الصعوبات التى توجد فى مزارع البروتوبلاست حيث أنه بعد إزالة الجدار فإن البروتوبلاست يكون جدار خلوى بسرعة كبيرة نسبياً وتصبح خلية بدلاً من البروتوبلاست. يمكن أيضاً عمل تزاج بين بروتوبلاست وآخر وفى بعض الحالات يحدث التزاوج بين بروتوبلاست وآخر بسهولة كبيرة وذاتياً وبسرعة كبيرة.

ولكن فى بعض الحالات يحدث التزاوج بين البروتوبلاست بصعوبة نسبياً وفى هذه الحالة نحتاج إلى إضافة نترات الصوديوم حيث تساعد على التزاوج بين البروتوبلاست، ولكن يستعمل فى الأغراض العملية وبكفاءة كبيرة مركب البولى إثيلين جليكول **polyethylene glycol** حيث أن هذا المركب له كفاءة عالية فى المساعدة على تزاوج البروتوبلاست.

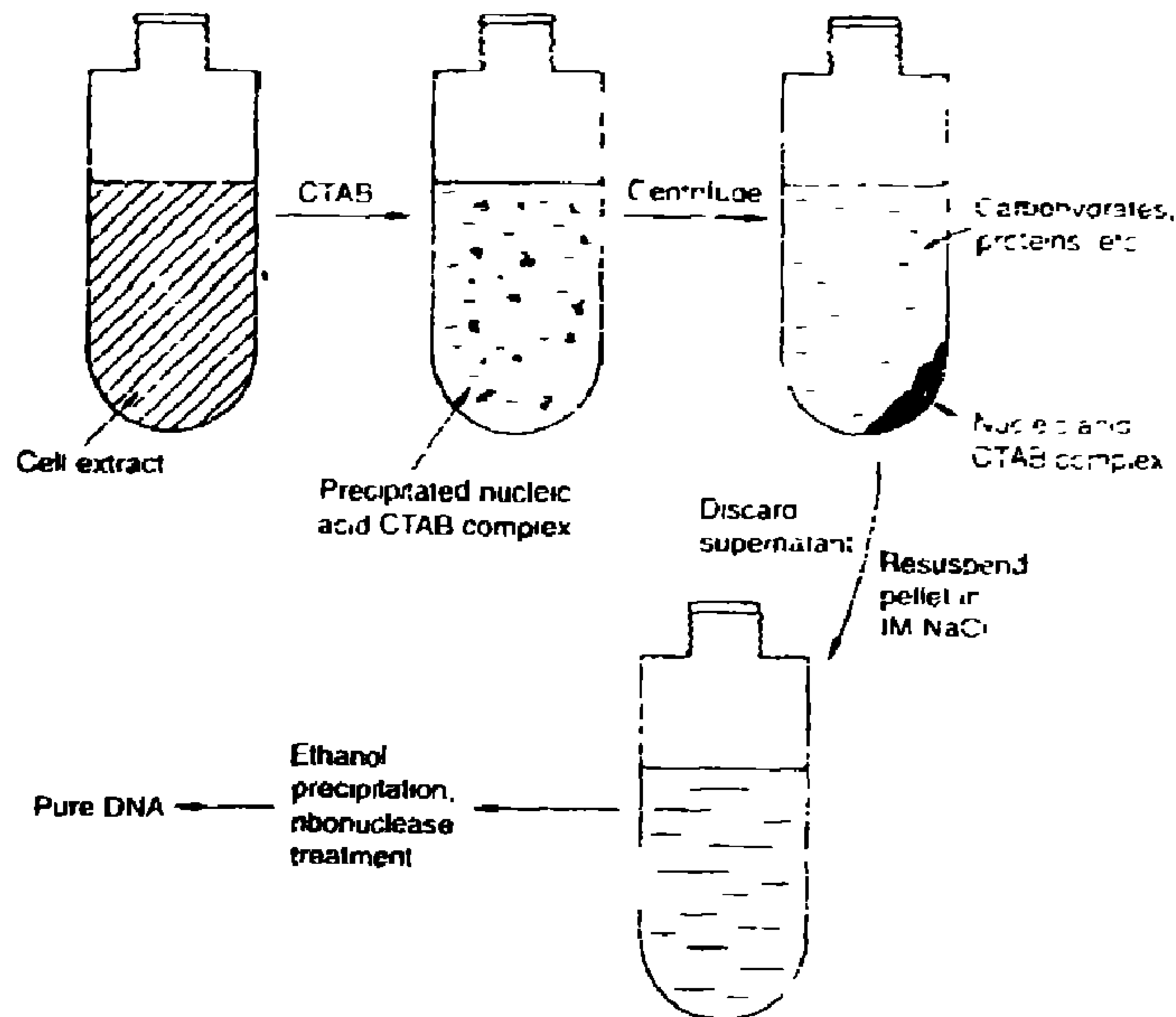
وعامة التزاوج بين البروتوبلاست نفس النبات يكون أسهل من التزاوج بين بروتوبلاست نباتين من صنفين مختلفين أو من نوعين مختلفين أو من جنسين مختلفين.

التطبيق الإقتصادى لظاهرة تزاوج البروتوبلاست

يمكن تطبيق ظاهرة تزاوج البروتوبلاست إقتصادياً وقد أجريت تجارب فى هذا الصدد فمن المعروف أن مرض التبقع البنى فى الفول المتسبب عن الفطر ***Botrytis fabae*** يسبب خسائر جسيمة فى كثير من الدول التى تزرع نبات الفول ومنها مصر. ولا يوجد أصناف مقاومة بالمعنى المفهوم لهذا المرض فى الفول العادى ***Vicia faba***. ولكن وجد أن **French beans** وأسمها العلمى ***Vicia narobensis*** فيها صفة المقاومة لهذا المرض فعند عمل التهجين بين بروتوبلاست من ***Vicia faba*** وبروتوبلاست من ***Vicia narobensis*** يمكن الحصول على بروتوبلاست وبالتالى نبات مقاوم لمرض التبقع البنى فى الفول حيث أن التهجين بين هذين النوعين بالطريقة العادية يحتاج إلى وقت كما إنه صعب الحدوث.

فى حالة خلية النبات تحتوى على مركبات أخرى إضافية وأهمها وجود كميات

كبيرة من المواد الكربوإيراتية والتى لا يمكن إزالتها بالفينول. يمكن إضافة منظف مناسب **detergent cetyltrimethylammonium** مثل (**CTAB**) (شكل ٧٤).

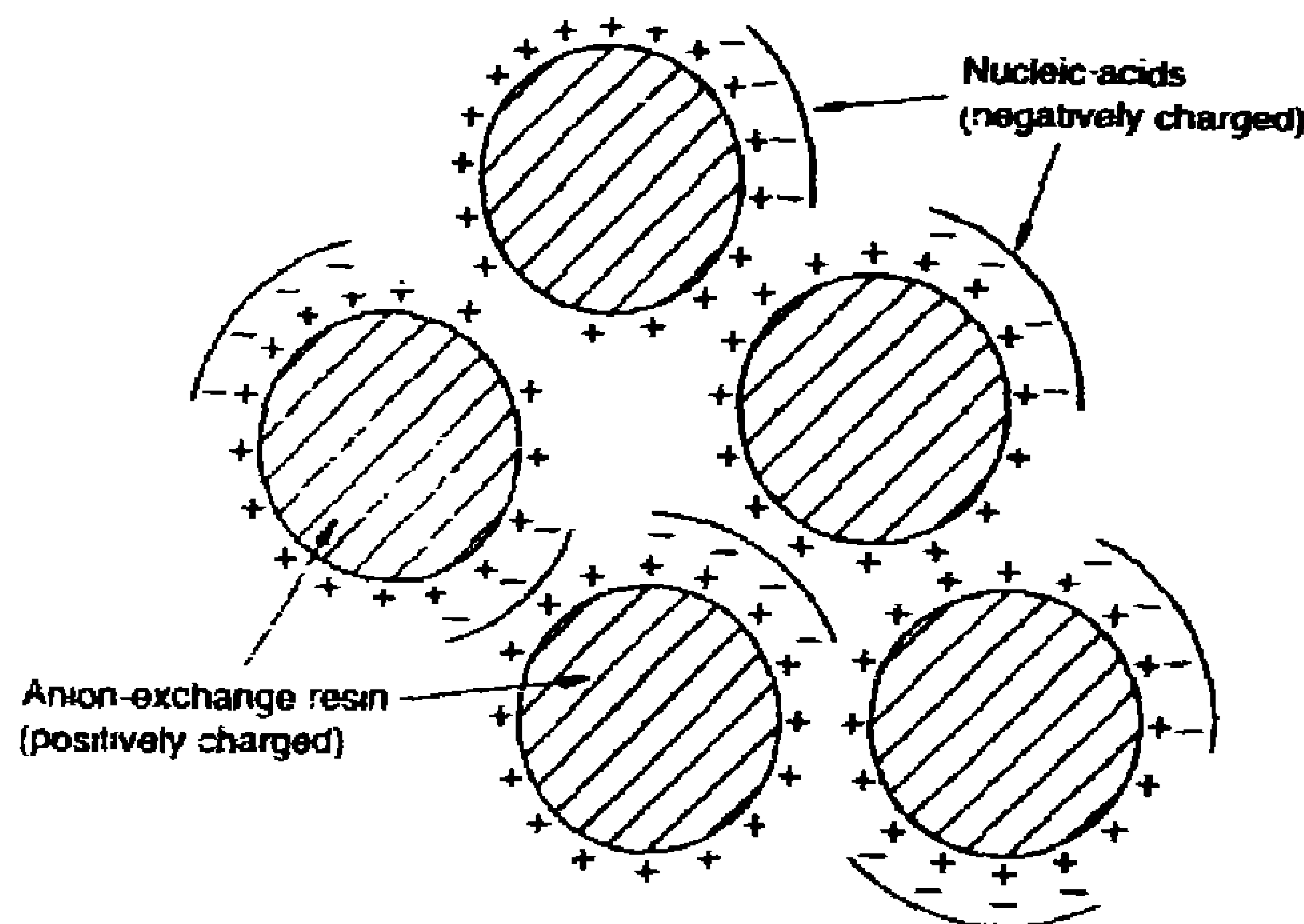


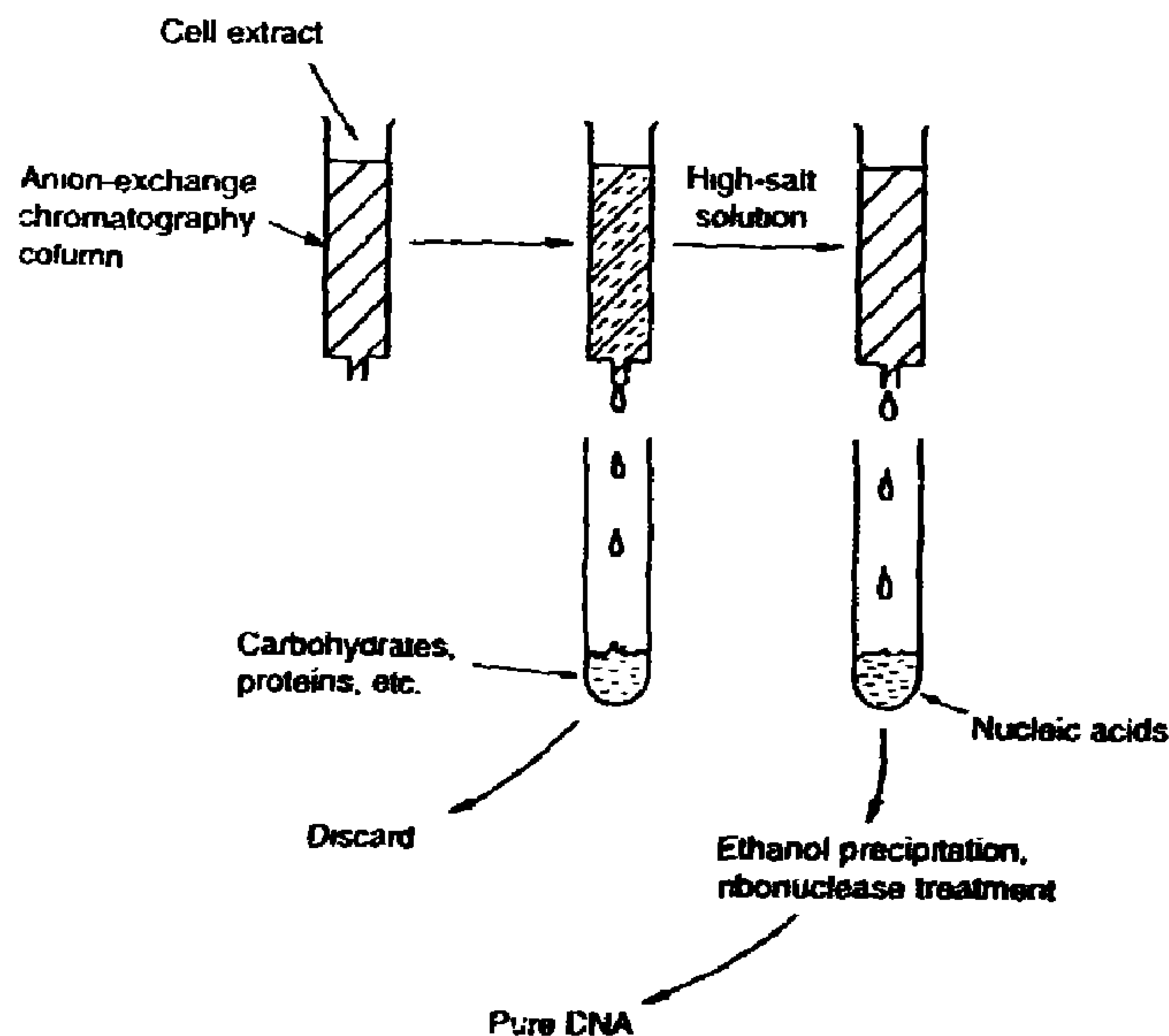
شكل ٧٤: طريقة **CTAB** لتنقية دنا من الخلايا النباتية.

والذى يكون مركب معقد غير قابل للذوبان مع الأحماض النووية يمكن فصله عن البروتين والكربوإيدرات كراسب فى حالة إستعمال الطرد المركزى. ثم يتم جمع الراسب ونشره فى محلول جزيئى من كلوريد الصوديوم وذلك يسبب كسر المركب المعقد. ثم يتم ترسيب الأحماض النووية بواسطة الإيثانول ويتم إزالة رنا بواسطة المعاملة بإنزيم **RNase**.

طريقة أخرى وهى أن الأحماض النووية عادة تكون سالبة الشحنة وهذا يعنى أن الأحماض النووية ترتبط مع الأسطح الموجبة الشحنة ويمكن إستخدام ذلك لفصلها بواسطة **anion-exchange chromatography resin** (شكل ٧٥)، أحد هذه الحالات هى إضافة الراتنج **resin** مباشرة لمستخلص الخلية ولكن يفضل إستعمال عمود كروماتوجرافى (شكل ٧٥) حيث يتم وضع الراتنج فى العمود ثم يضاف مستخلص الخلية. ترتبط الأحماض النووية السالبة الشحنة بالراتنج الموجب الشحنة وتبقى

محتجزة بالعمود بينما الملوثات الموجبة والمتعادلة تمر بسهولة مـن العمـود بعـد غسيل الملوثات من العمود تماماً يتم إضافة محلول ملحى high-salt solution والذى يسبب إختلال الإتزان للإرتباط الإلكتروستاتيكى بين الحامض النووى والراتنج. يمكن بذلك غسيل الأحماض النووية بسهولة من العمود ثم يتم ترسيبها بالإيثانول ثم يـتم إزالة رنا بإستعمال RNase وبالتالى يوجد دنا نقى.





شكل ٧٥:

(a) تنقية دنا بواسطة anion exchange chromatography.

(b) تنقية دنا بواسطة column chromatography.

ثانياً – تنقية البلازميد (تنقية دنا)

Preparation of Plasmid DNA

الخطوات المتبعة فى تحضير البلازميدات هى تماماً كما سبق شرحه فى تحضير دنا الكلى من الخلية ولكن بعد ذلك توجد خطوات إضافية لعزل البلازميد أى دنا البلازميد من دنا الكلى للخلية. توجد خاصتين هامتين يمكن على أساسهما فصل البلازميد وهما حجم البلازميد حيث أن أكبر بلازميد لا يتعدى ٨% من حجم الكروموسوم البكتيرى والخاصية الثانية أن البلازميد حلقى أما دنا الأخرى شريطية أى خيطية ولكن الكروموسوم البكتيرى حلقى ولكن أثناء تحضير وإستخلاص دنا الكروموسوم من الخلية عادة يتمزق الكروموسوم أو يقطع أو ينكسر إلى شريط طولى أو شرائط طولية ولذلك فإن الطريقة المناسبة لعزل البلازميد الحلقى من الجزيئات الشريطية تكون فعالة.

١ – الفصل على أساس الحجم Separation on the basis of size:

فى هذه الحالة تكون طريقة تحضير دنا الكلى من الخلية مختلفة نوعاً. حيث أن كسر الخلية يجب أن يكون برقة جداً ليمنع كسر وتجزيىء دنا الكروموسوم إلى قطع صغيرة وبذلك يصعب فصل البلازميد عن دنا الكروموسوم بالطرد المركزى. وفى حالة البكتيريا إ. كولاى يجب عمل كسر محكوم ومضبوط ومتحكم به بقدر. المعاملة بالليزوزيم و EDTA تحدث فى وجود السكروز والذى يمنع الخلية من الإنفجار ولذلك يتكون شكل كروى غير منفجر يسمى الجسم الكروى sphaeroplast. وهذا الجسم الكروى يتميز بأن الجدار مفتت أو مكسور إلى أجزاء ولكن الغشاء البلازمى (البلازماليما أى الإكتوبلاست) سليم تماماً. يجرى عمل تحليل للجسم الكروى بواسطة منظف غير أيونى non ionic detergent مثل تريتون X-١٠٠ (triton x-100) حيث أن المنظفات الأيونية ionic detergent مثل SDS تسبب تكسير للكروموسوم. وبذلك فإن هذه الطريقة تكون مناسبة جداً لعدم تكسير الكروموسوم إلى أجزاء صغيرة

ولذلك عند عمل الطرد المركزى يرسب الكروموسوم ويصبح الجزء العلوى أى cleared lysate حاوى للبلازميد.

٢ - الفصل على أساس الشكل والتركيب Separation on the basis of conformation:

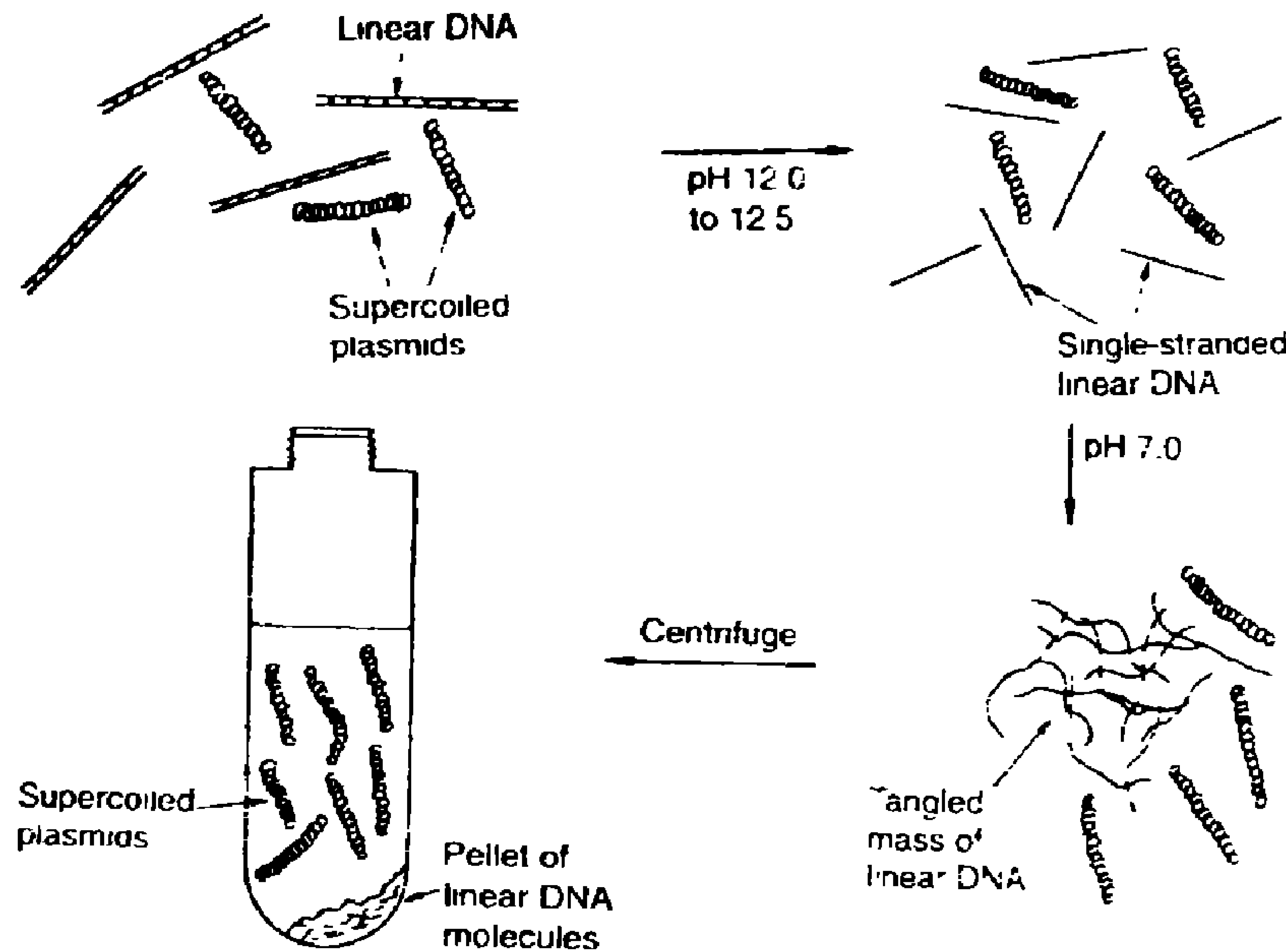
أغلب البلازميدات توجد فى صورة حلزنة زائدة supercoiled فى الخلية ولذلك ليست من الصحيح القول بأن البلازميدات حلقية. تحدث الحلزنة الزائدة supercoiling لأن الحلزونين المكونين للبلازميد تكون جزئياً مفكوكة partially unwound أثناء تخليق البلازميد بواسطة إنزيمات topoisomerases. تستمر حالة الحلزنة الزائدة مع البلازميد لو أن الحلزونين سليمين غير مقطوعين وتسمى فى هذه الحالة covalently closed circular DNA (ccc).

فى حالة كسر أحد الحلزونين فى مكان واحد على الأقل سيحدث لذلك إرتخاء لكلا حلزونى دنا relaxation وتصبح فى الحالة الطبيعية حالة الإرتخاء relaxed state ولذلك فإن البلازميد سيأخذ شكل آخر ويسمى الحلقة المفتوحة open-circular (oc).

أ- الدنترة القلوية Alkaline denaturation:

أساس هذه الطريقة أنه يوجد مدى ضيق لـ pH فيه دنا العادى يحدث له دنترة بينما البلازميدات وهى عادة زائدة الحلزنة supercoiled لا تحتوى هذه الصفة. عند إضافة إيدروكسيد الصوديوم إلى مستخلص الخلايا أو إلى الرائق cleared lysate المحتوى البلازميدات وضبط pH عند ١٢ إلى ١٢,٥ ونتيجة لذلك يحدث كسر للروابط الإيدروجينية فى دنا العادى ولا يحدث فى البلازميد زائد الحلزنة ونتيجة لذلك ينفصل حلزونى دنا عن بعضهما ثم يضاف بعد ذلك حامض يسبب تجمع أشرطة دنا فى كتلة شبكية متداخلة وبعد ذلك يتم عمل طرد مركزى فترسب هذه الكتلة تاركة البلازميد النقى فى الرائق supernatant. من مزايا هذه الطريقة أيضاً إنه فى بعض الظروف خاصة عند عمل تحلل للخلايا بواسطة SDS ثم المعادلة بواسطة خلات

الصوديوم فإن أغلب البروتين ورنا يصبح غير قابل للذوبان ويمكـــن أيضـــاً فصـــله بالطرد المركزى (شكل ٧٦).



شكل ٧٦: تنقية البلازميد بواسطة الدنترة القلوية.

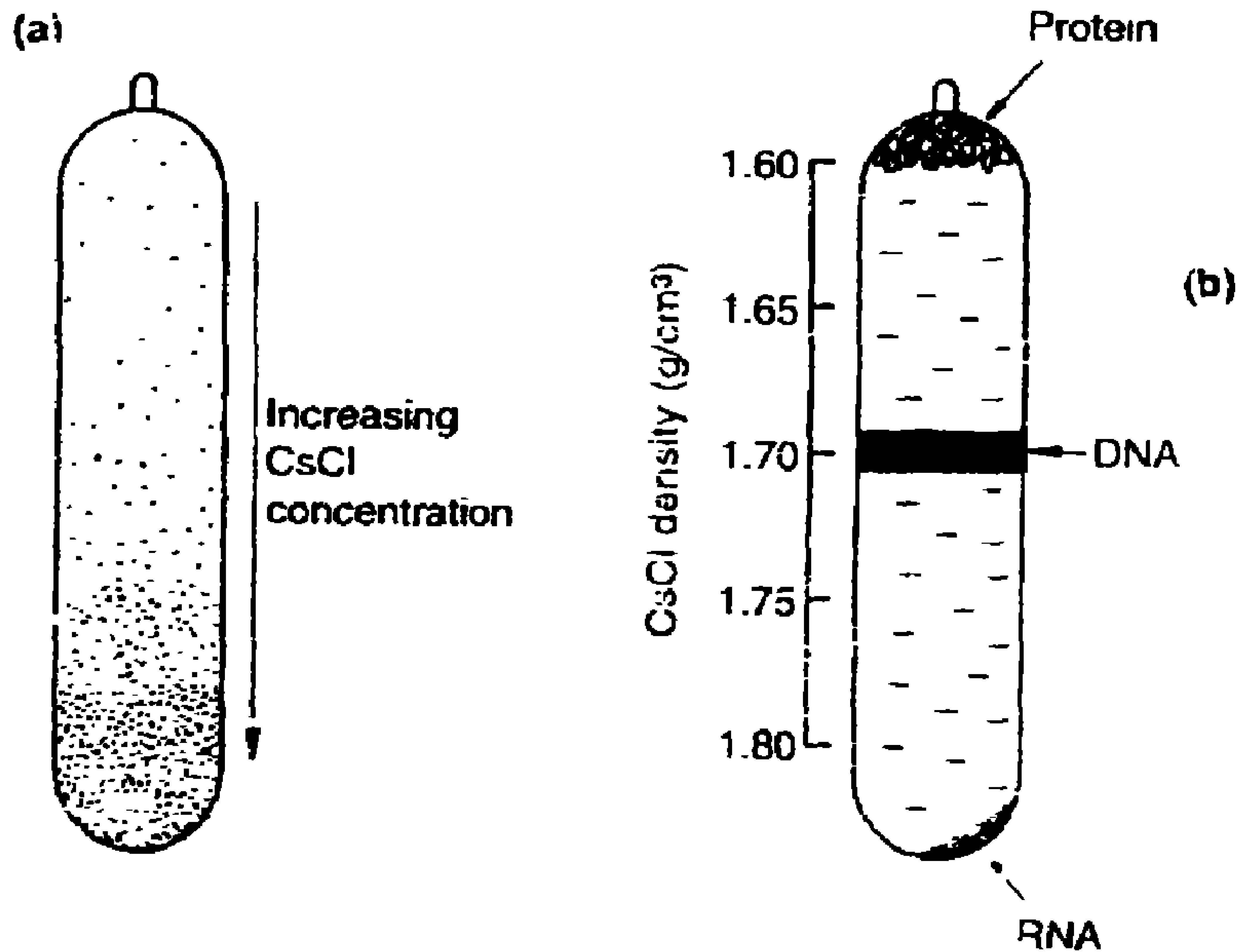
ب – الطرد المركزى المتدرج بواسطة بروميد الاثيديم وكلوريد السيزيوم

Ethidium bromide-caesium chloride density gradient centrifugation

يحدث الطرد المركزى المتدرج بواسطة عمل طرد مركزى لمحلول مـن كلوريـــد السيزيوم (CsCl) على سرعة عالية جداً. يحدث التدرج لوجود قوة طاردة مركزيـــة عالية تجذب أيونات السيزيوم والكلور فى إتجاه قاع الأنبوبة. هجرة هذه الأيونات إلى قاع الأنبوبة يتدخل ويتزن مع حالة الإنتشار ولذلك ينشأ تدرج فى التركيز حيـــث أن كثافة كلوريد السيزيوم أكبر فى قاع الأنبوبة.

الجزيئات الكبيرة الموجودة فى محلول كلوريد السيزيوم عند عمل طرد مركـــزى لها ستكون حزم عند أماكن معينة من التدرج. يتوقف جزمة جزيىء معين على كثافة

الطفو أى العوم buoyant density الخاصة به. كثافة الطفو لدنا حوالى ١,٧ جم/سم٣ ولذلك فإنها تهاجر إلى منطقة فى التدريج فيها كثافة كلوريد السيزيوم أيضاً ١,٧ جم/سم٣. على العكس من ذلك فإن جزيئات البروتين لها كثافة طفو أقل ولذلك فإنها تطفو إلى أعلى فى إتجاه قمة الأنبوبة بينما يكون رنا راسب فى القاع (شكل ٧٧). وهكذا فإن الطرد المركزى يمكنه أن يفصل دنا عن رنا والبروتين ويعتبر ذلك بديل لعملية الإستخلاص بالفينول والمعاملة بـ RNase لتنقية دنا.



شكل ٧٧: الطرد المركزى المتدرج بواسطة كلوريد السيزيوم، (أ) تدرج فى تركيز كلوريد السيزيوم بواسطة طرد مركزى فائق السرعة، (ب) فصل البروتين ودنا ورنا فى تدرج كلوريد السيزيوم.

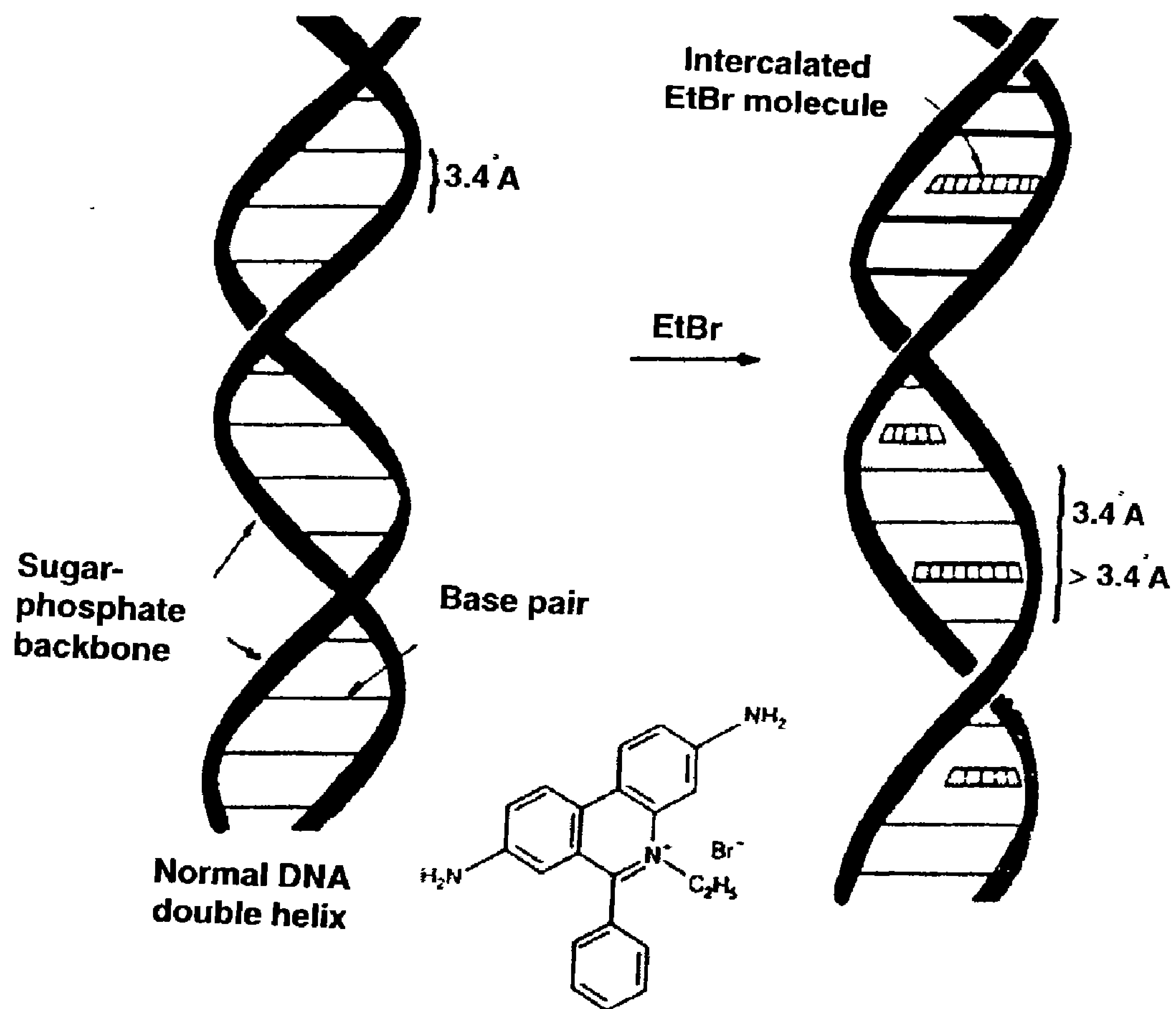
أكثر أهمية من ذلك، الطرد المركزى المتدرج فى وجود بروميد الإثيديم (EtBr) يمكن أن يستخدم فى فصل دنا الزائد الحلزونية عن الجزيئات العادية. هذه الجزيئات من بروميد الإثيديم يمكن أن تتخلل جزيئات دنا العادية بسهولة وبكمية أكبر حيث تسبب فك نسبى للجزيىء وتدخل بين حلزونى دنا مسببة قلة أى خفض فى كثافة الطفو بدرجة كبيرة نسبياً (شكل ٧٨) بدرجة ٠,١٢٥ جم/سم٣ والعكس صحيح فى

حالة دنا البلازميد حيث أنه لا يمكن فكه بسهولة لأه زائد الحلزنة وليس له أطـراف حرة بعكس جزىء دنا العادى الذى له أطراف حرة ولذلك يمكن فكه بسهولة ودخول جزيئات بروميد الإثيديم بتركيز أعلى فى حالة دنا العادى عنه فـى حالـة البلازميـد ولذلك فإن الإنخفاض فى كثافة الطفو يكون قليل جـداً ٠,٠٨٥ جـم/سـم[٣] وذلـك بالمقارنة بدنا العادى. ولذلك فإن الجزيئات زائدة الحلزنة أى البلازميد سوف يكـون لها موقع بالأنبوبة يختلف عن مكان دنا العادى أو عن مكان الحلقة المفتوحة. لـذلك فإن دنا الشريطى أو ذو الحلقة القتوحة سيكون أعلى دنا زائد الحلزونية فى الأنبوبة (شكل ٧٩). تعتبر هذه الطريقة زائدة الفاعلية فى فصل البلازميدات حيـث سـيكون البروتين فى أعلى الأنبوبة يليه دنا العادى يليه دنا زائد الحلزونية يليه فى القاع رنا. مكان حزم دنا يمكن ؤويته بواسطة الأشعة فوق البنفسجية حيث تسبب هذه الأشـعة فلورة لجزيئات بروميد الإثيديم المرتبطة بدنا. يمكن سحب البلازميد مـن الأنبوبـة وذلك بواسطة ثقب جانبى وعن طريق حقنة عادية (شكل ٧٩). يتم سـحب كلوريـد الإثيديم المرتبط بدنا بواسسطة البيوتانول n-butanol ثم يتم إزالة كلوريد السـيزيوم بواسطة الفرز الإنتشارى (شكل ٧٩). يعتبر تحضير البلازميد النـاتج نقـىَ تمامـاً ١٠٠% ويمكن إستعماله كناقل وسيط للتوطين cloning vehicle.

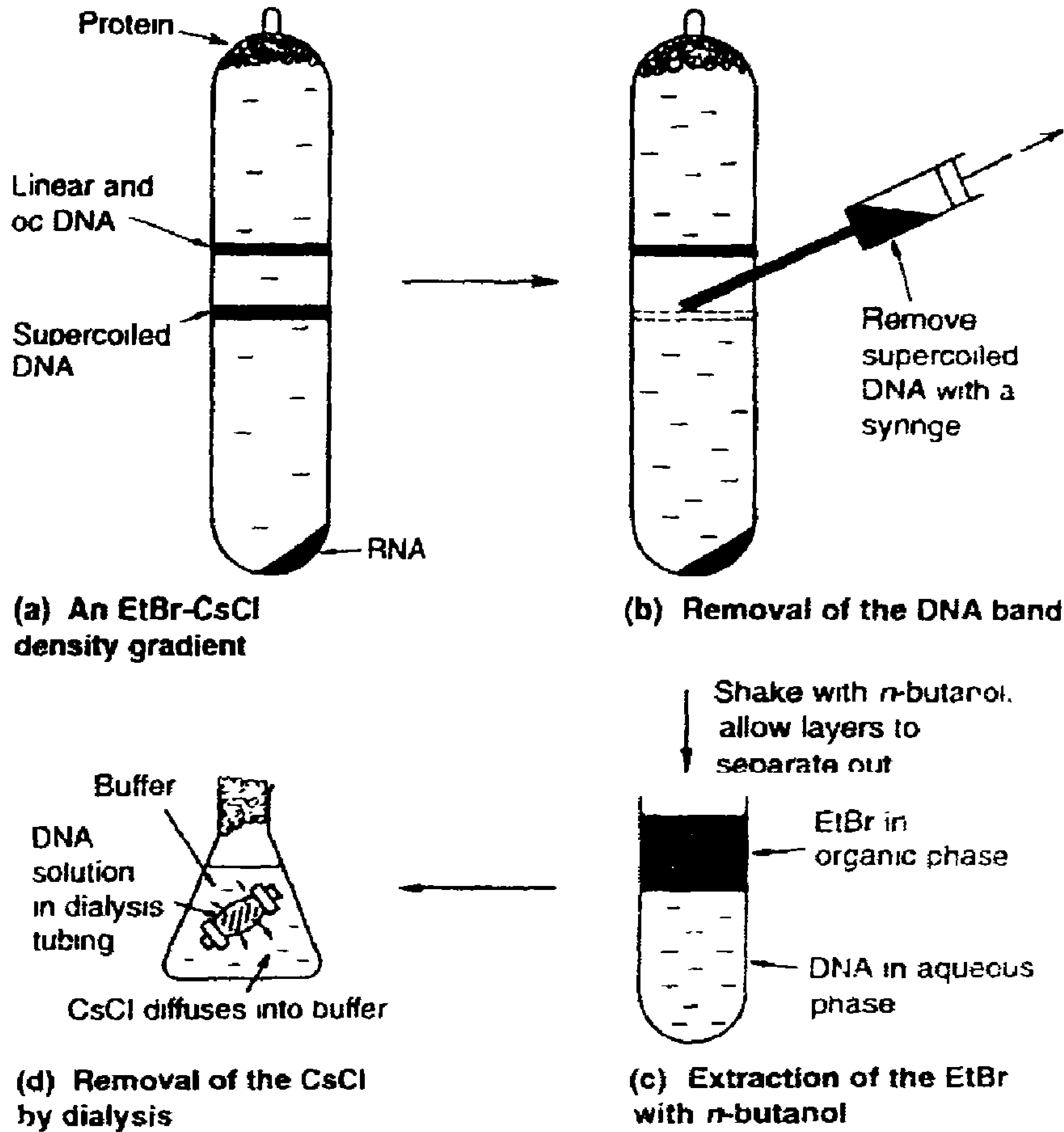
زيادة كمية البلازميدات Plasmid amplification:

عادة تكون كمية البلازميد بالنسبة لكمية دنا الكلى فى خلايا البكتيريا ضئيلة وهذه الكمية القليلة غير مناسبة لتجارب الهندسة الوراثية. يمكن إستخدام أنواع أخرى من البلازميدات تسمى بلازميدات عديدة النسخ multicopy plasmids حيث يصـل عـدد البلازميدات فى خلية البكتيريا الواحدة إلى عشرون أو أكثر كما أن لها خاصية مفيدة جداً وهامة جداً أنها يمكن أن تتكاثر فى غياب تخليق البروتين وذلك علـى العكـس تماماً من الكروموسوم البكتيرى الذى لا يمكن أن يتكاثر تماماً فى هـذه الظـروف. ولذلك بعد نمو البكتيريا على البيئة لدرجة معينة يتم إضافة مثبط لتخليـق البـروتين

مثل الكلورامفينكول ثم يتم تحضين المزرعة لمدة ١٢ ساعة. أثناء هذه الفترة يتكاثر البلازميد بسرعة بالرغم من توقف الخلية عن الإنقسام وأيضاً الكروموسوم وبذلك يزداد البلازميدات بدرجة كبيرة فى الخلية الواحدة حيث يصل عدد البلازميدات إلى عدة آلاف أو يزيد. وهكذا فإن عملية الزيادة amplification هامة فى زيادة عدد البلازميدات فى السلالات التى بها عديد من النسخ أى أنها هامة فى حالة السلالات عديدة النسخ من البلازميدات.



شكل ٧٨: تركيب بروميد الإثيديم. وجزىء دنا العادى (شمال) وجزىء دنا عادى متداخل معه جزيئات بروميد الإثيديم (يمين).



شكل ٧٩: تنقية دنا البلازميد بإستخدام طريقة الطرد المركزى المتدرج بإستخدام كلوريد السيزيوم وبروميد الإثيديم، (a) فصل المركبات المختلفة بروتين ودنا عادى ودنا بلازميد ورنا، (b) إزالة دنا البلازميد بحقنة عادية من الأنبوبة، (c) إستخلاص بروميد الإثيديم بواسطة البيوتانول، (d) إزالة كلوريد السيزيوم بالفرز الإنتشارى.

ثالثاً – تحضير دنا الفاج

Preparation of Bacteriophage DNA

تعتبر هذه الطريقة أسهل فى خطواتها نوعاً ما عما سبق حيث أنه فى هذه الحالة لا نحتاج إلى إستخلاص من الخلية حيث أن الفاج يمكن الحصول عليه من خارج الخلية البكتيرية وبسهولة من البيئة السائلة. وعند عمل طرد مركزى للبيئة النامية

عليها البكتيريا ترسب البكتيريا فى القاع ويوجد الفاج فى الرائق supernatant. ثـم يعامل الفاج بخطوة واحدة فقط وهى لنزع بروتين الكابسيد ويصبح دنا الفاج نقـى. وفى حالة التجارب العملية يكون من المناسب للفاج لامدا λ يكون ١٠^١٠ لكـل مـل. ينتج عن ١٠^١٠ جزىء من لامدا ٥٠٠ نانوجرام من دنا. تحتاج إلى أحجام كبيرة من المزارع حوالى ٥٠٠ إلى ١٠٠٠ مل للحصول على كميات مناسبة من دنا لامدا.

أ – تنمية المزارع للحصول على تركيز عال من الفاج لامدا

Growth of cultures to obtain a high λ titre:

يوجد الفاج λ على هيئة بروفاج prophage مكمل لدنا الخلية البكتيرية ويوجد فى حالة lysogen ولذلك يكون التركيز الخارجى من الفاج قليل جداً. ولذلك لابد من عمل عملية induction للبكتيريا لإنتاج الفاج. المقصود بكلمـة induction هـى عمليـة دخول البكتيريا إلى مرحلة التحلل لكى يحدث تحليل وإنفجار للبكتيريا وموتها وتحرر جزيئات الفاج لامدا فى البيئة. من الصعب عمل ذلك ولذلك تستعمل المعامل سـلالات حساسة من الفاج لامدا تحمل طفرة حساسة للحرارة تسمى temperature-sensitive (ts) mutation وموقع هذه الطفرة فى الجين cI ولـذلك لا تحـدث حالـة التكامـل lysogeny إطلاقاً مع دنا البكتيريا ويحدث تحلل لخلايا البكتيريا حيث أنه فـى عـدم وجود الطفرة فى هذا الجين يكون الفاج عادى ويلتحم ويكمل دنا البكتيـرى lysogen ولذلك لابد من وجود الطفرة فى هذا الجين لكى يحدث التحلل للبكتيريا يمكـن أيضـاً إزالة الجين *cI* تماماً deletion وهكذا تحدث طفرة أيضاً فى حالة إسـتخدام الطفـرة بالنقص deletion يمكن إنتاج محصول كبير من الفاج لامدا وتحتاج هذه الحالة إلـى كفاءة فى موعد إضافة الفاج للمستعمرة البكتيرية أى يكون عمر المزرعـة مناسـب فإذا كانت المزرعة صغيرة السن وعدد الخلايا قليل نسبياً فإن خلايا البكتيريا يحـدث لها تحلل سريع بعد إضافة الفاج، ويكون محصول الفاج قليل. إذا كان عمر المزرعة كبير فإن عدد الخلايا يكون كبير وعند إضافة الفاج عدد قليل مـن الخلايـا سـيتحل وهكذا يكون محصول الفاج قليل. عندما يكون عمر المزرعة متوسط ومناسب فإنـه

بعد إضافة الفاج فإن المزرعة تستمر فى النمو لفترة ما ثم يحدث لها تحلل وفى هذه الحالة نحصل على أعلى محصول من الفاج. وهكذا يجب أن يكون هناك موازنة بين حجم لقاح الفاج وعمر مزرعة البكتيريا وعدد خلاياها وأن يكون إضافة حجم اللقـــاح المناسب فى الوقت المناسب وفى هذه الحالة تحتاج إلى كفاءة ومهارة وخبرة الباحث وهكذا يتميز باحث عن آخر.

عن كيفية إتمام عملية الـــ induction والتى يمكن أن نعبر إستحثاث تكوين الفاج وموت وتحلل خلية البكتيريا لتحرر جزيئات الفاج فى البيئة. يمكن إتمام ذلك بواسطة السلالات المحتوية على طفرة فى الجين الحساس للحرارة *cI* حيث أنــه فــى هــذه الطفرة فى درجة حرارة ٣٠° مئوية تحدث عملية lysogeny عادية يسمى هذا الجــين أيضاً *cIts* أى حساس لدرجة الحرارة العالية. ولكن عند نقل المــزارع مــن درجــة حرارة ٣٠° مئوية إلى ٤٢° مئوية فإ، هذا الجين الطفرة يفقد تحكمــه فــى إســتمرار حدوث حالة lysogeny وتحدث فى درجة ٤٢°م مئوية تحــرر جزيــىء الفــاج مــن كروموسوم البكتيريا ويصبح مستقل ويحدث حالة موت وإنفجــار الخليــة البكتيريــا وتحرر الفاج. أى أن هذا الجين المتطفر يتحكم فى درجة حــرارة ٣٠° مئويــة فــى حدوث حالة lysogeny وقادر على حدوثها ولكن فى درجات الحرارة العاليــة نســبياً ٤٢ مئوية يفقد قدرته فى التحكم فى حدوث lysogeny ولذلك يحدث للخليــة مــوت وإنفجار وتحرر لجزيئات الفاج لامداء (شكل ٨٠).

ب – جمع الفاج من خلايا البكتيريا المصابة:

Collection of phage from an infected culture:

يمكن فصل الفاج من خلايا البكتيريا المحطمة والخلايا السليمة بالطرد المركــزى بسرعة عالية حيث ترسب بقايا البكتيريا ويوجد الفاج فــى الرائــق supernatant. تكون المشكلة هنا هو إختصار حجم الرائق إلى ٥ مل أو أقل وهو الحجم المناســب لإستخلاص دنا. يتم ترسيب الفاج بواسطة بولى إيثلين جليكول Polyethylene (PEG) glycol. وهو عبارة عن بوليمر طويل السلسلة يمتص الماء فى وجود الأملاح مثــل

كلوريد الصوديوم ولذلك تتجمع جزيئات الفاج عليه لتترسب. يمكن جمع الراسب بالطرد المركزى ثم إعادة تعليقه أى نشره فى كمية قليلة من محلول مناسب.

جـ - تنقية دنا من جزيئات الفاج لامدا

Purification of DNA from λ phage particles

يمكن تنقية دنا من البروتين وذلك بأى معاملة مناسبة لإزالة البروتين deproteinization من الفاج الناتج من المرحلة السابقة. ولكن عادة فى حالة الفاج لامدا نحتاج إلى خطوة وسيطه قبل ذلك بواسطة طرد مركزى متدرج بواسطة كلوريد السيزيوم وذلك لفصل الفاج عن آثار أو بقايا حطام خلايا البكتيريا، حيث أن راسب PEG عادة ما يحتوى على آثار من حطام الخلايا البكتيرية. سيكون الفاج لامدا فى الأنبوبة بعد الطرد المركزى التدريجى فى الموقع ذو الكثافة بين ١,٤٥ إلى ١,٥٠ جرام/سم^{٣}.

يتم سحب الفاج من الأنبوبة بعد ثقبها فى مكان الفاج وسحب الفاج من الثقب بواسطة حقنة عادية. ثم إزالة كلوريد السيزيوم من الجزء المسحوب المحتوى على الفاج بواسطة الفرز الإنتشارى. يصبح تحضير الفاج نقى ومن هذا الفاج يستخلص دنا وذلك بالمعاملة بالفينول أو إنزيم protease لهضم غلاف الفاج البروتينى.

د - تنقية دنا الفاج M13

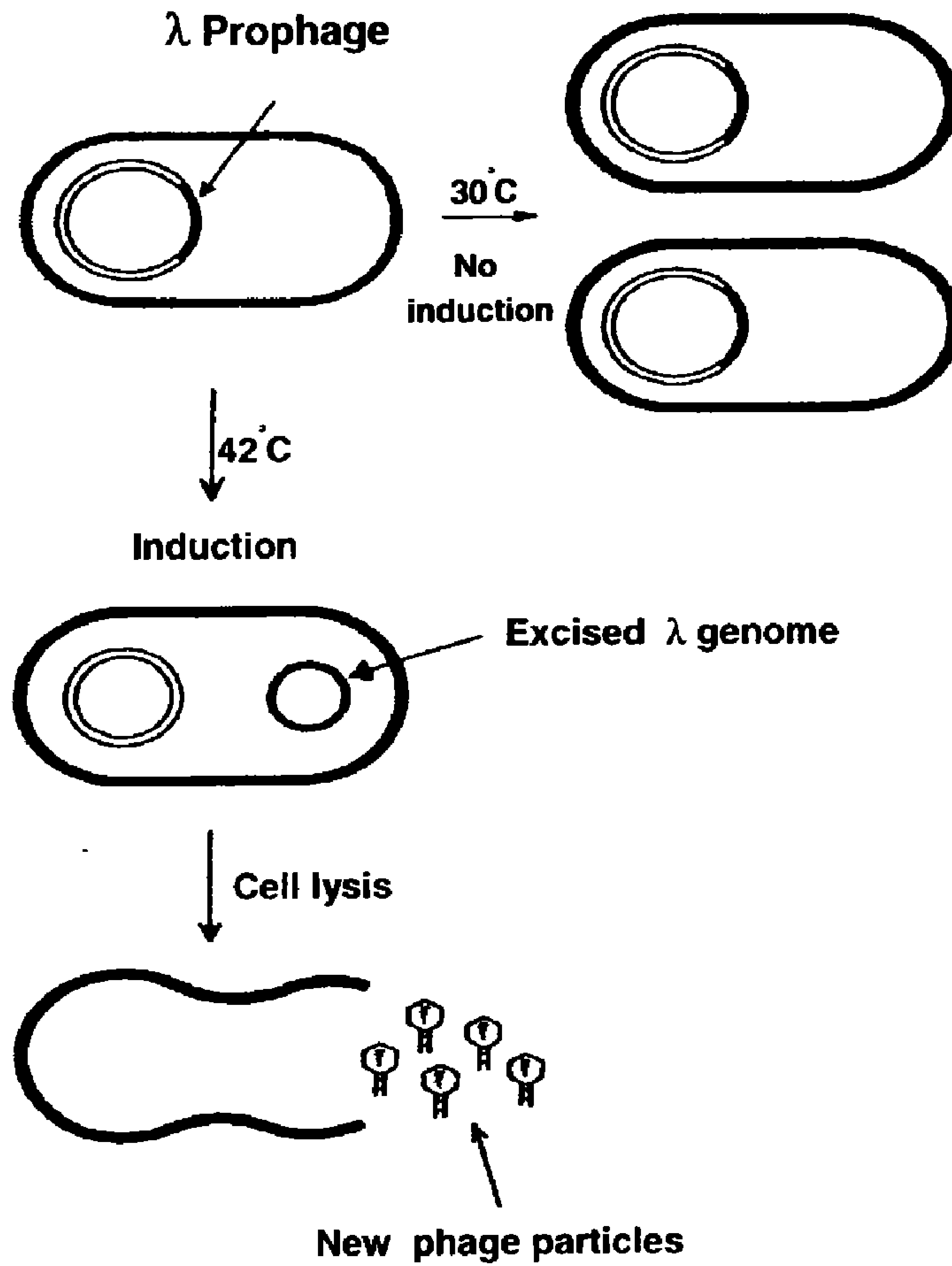
Purification of M13 DNA

تنقية دنا الفاج M13 ثنائى الحلزون أى الشريطى أى الخيط ds تماثل إلى حد كبير تنقية البلازميدات. حيث يتم تحضير مستخلص خلايا من خلايا البكتيريا المصابة بالفاج M13 ثم فصل الطور التكاثرى للفاج أى ثنائى الخيط dsDNA من دنا البكتيريا بواسطة طريقة الطرد المركزى المتدرج بواسطة كلوريد السيزيوم وبروميد الإثيديم.

لفهم هذا الفاج يجب شرح نبذة عنه حيث أن يختلف عن الفاج لامدا تماماً. يعتبر الفاج M13 فاج خيطى الشكل ويختلف فى تركيبه تماماً عن الفاج لامدا. حجم جزيىء

دنا فى الفاج M13 أصغر كثيراً من حجم جزيىء دنا لامدا حيث أن حجم جزيىء دنـــا M13 أى طاقم الوراثى genome عبارة عن طول يتكون من ٦٤,٧ نيوكليوتيدة فقط. هذا الطول يكون على هيئة حلقة أى أن دنا حلقى الشكل ويتكون من جزء دنا وحيـــد الخيط أى الحلزون ssDNA.

يدل الحجم الصغير لدنا الفاج M13 على أن عدد جيناته أقل من عدد جينات الطاقم الوراثى للفاج لامدا. هذا صحيح حيث أن الغلاف فى M13 يتكون من عديد من النسخ لثلاثة بروتينات فقط أى أن يحتاج ثلاثة جينات فقط فى حين أن تخليق رأس وذيـــل الفاج لامدا يشتمل على ١٥ نوع من البروتينات. بالإضافة إلى ذلك فإن الفـــاج M13 له نظام لإصابة خلية البكتيريا أبسط بكثير من النظام اللازم للفاج لامدا وأحد الأمثلـــة على ذلك أن الفاج M13 لا يحتاج إلى جينات لكى يصبح دنا جزء من الطاقم الوراثى لخلية البكتيريا does not need genes for insertion into the host genome بينمـــا يحتاج الفاج لامدا ذلك.



شكل ٨٠: عملية induction فى حالة وجود طفرة فى الجين *cI* وتسمى *cIts* والتى تسبب حدوث lysis فى درجة حرارة ٤٢° مئوية ولا تسبب حدوث lysis أى لا يحدث induction فى درجة حرارة ٣٠° مئوية.

حقن دنا الفاج M13 فى خلية البكتيريا يحدث عن طريق الهدبيات والمفرد هديب pilus (هى زوائد دقيقة توجد على خلية البكتيريا لازمة لعملية التزاوج الجنسى حيث تساعد على ربط الخليتين المتزاوجتين مع بعضهما) ويكون الفاج عبارة عن دنا مفرد الخيط ssDNA وعندما يستقر الفاج داخل البكتيريا فإن الخيط المفرد من دنا يعمل كأصل ويتكون مكمل له خيط مفرد آخر وهكذا يصبح الفاج داخل الخلية البكتيرية ثنائى الخيط dsDNA. هذا الجزيىء من دنا لا يلتحم مع الطاقم الوراثى للخلية البكتيرية ولكنه بدلاً من ذلك يتكاثر ليصبح بداخل خلية البكتيريا الواحدة أكثر من مائة نسخة أى أكثر من مائة جزيىء. تسمى هذه الجزيئات من دنا ثنائية الخيط dsDNA

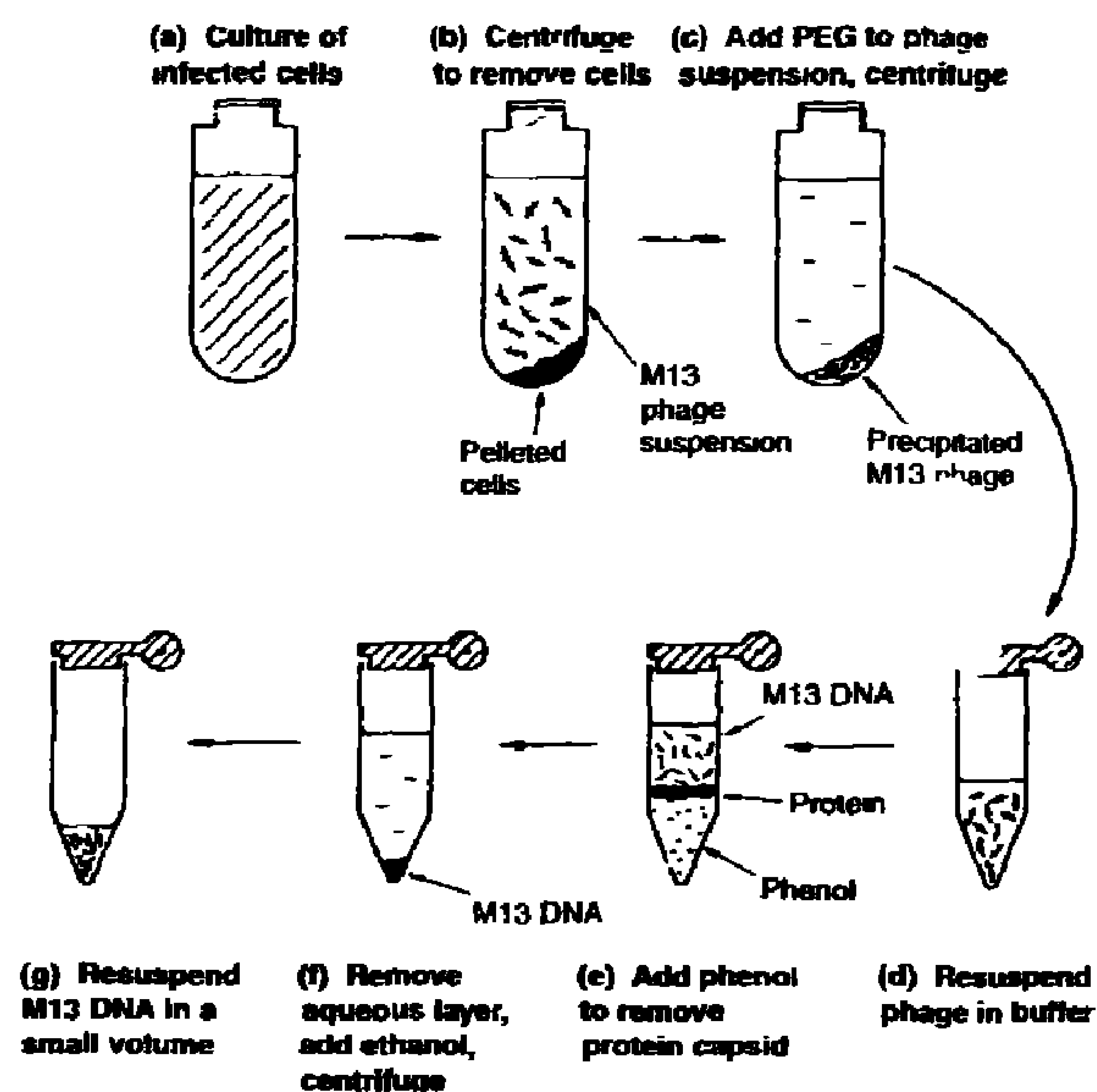
بالأشكال التكاثرية replicative forms وإختصارها RF. وهكذا يحدث التكاثر داخل خلية البكتيريا بهذا الشكل. عند إنقسام الخلية البكتيرية إلى خليتين فإن كل خلية يوجد بها عديد من الطاقم الوراثى للفاج أى عديد من RF والتى تتكاثر لتصل إلى العدد المحدد لها داخل خلية البكتيريا وهو أكثر من مائة جزيىء. بعد ذلك عند إنتاج جزيىء الفاج المتكامل فى الخلية البكتيرية فغ، دنا الثنائى الخيط يتكاثر بتكوين نظام فك كر وهو ما يسمى rolling circle mechanism حيث ينتج عن ذلك جزيىء دنا عادى ولكنه وحيد الخيط ويكون خيطى الشكل فى البداية ssDNA. ثم يحدث له أن يغلق ليكون شكل حلقى circulization ثم يتكون البروتين ويتجمع البروتين مع دنا وحيد الخيط ليكون جزيىء فاج M13 متكامل أى ناضج mature phage particle (شكل ١٥١).

لكن الطور والذى يتكون من دنا وحيد الخيط ssDNA أى فة جزيئات الفاج الناضجة الموجودة خارج الخلية البكتيرية فإنه كثيراً ما يكون مطلوب لأبحاث الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية حيث أنه يحتوى على نسخة واحدة من الجينات.

وحيث أن خلايا البكتيريا المصابة دائماً تفرز فى البيئة جزيئات الفاج M13 وحيث أنه لا يحدث إنفجار لخلايا البكتيريا إطلاقاً، فإنه تبعاً لذلك يمكن الحصول على تركيز عال من جزيئات الفاج M13 من بيئة البكتيريا المصابة بالفاج. وفى الحقيقة فإنه يمكن الحصول على تركيزات عالية من الفاج وهى $١٠^{١٢}$ جزيىء فاج لكل مل من البيئة بسهولة جداً دون الإحتياج إلى طرق خاصة. معنى ذلك أن تركيزات عالية جداً من الفاج ssDNA يمكن الحصول عليها من حجم صغير ٥ مل أو أقل. وأيضاً يلاحظ أن الخلية البكتيرية لا تتحلل ولذلك يصبح معلق الفاج نقى خال من أى بقايا خلايا البكتيريا وهذا بالطبع أكثر تفضيلاً ولذلك نادرًا ما نحتاج إلى الخطوة المتبعة مع الفاج لامدا وهى عمل عملية الطرد المركزى المتدرج بإستخدام كلوريدد السيزيوم.

وبإختصار عملية تنقية هذا الفاج يمكن وصفها فى الحصول على حجم صغير من البيئة السائلة للبكتيريا المصابة ثم عمل عملية طرد مركزى ثم ترسيب جزيئات الفاج

بواسطة PEG ثم طرد مركزى ثم أخذ الراسب وتعليقه فى محلول منظم ثم إضافة الفينول لإزالة غلاف الفاج البروتينى ثم الرج سيرسب دنا الفاج فى قاع الأنبوبة ثم تزال الطبقة السائلة ويبقى دنا راسب فى القاع ثم يضاف إيثانول للراسب ثم الطرد المركزى ثم عمل معلق صغير الحجم من دنا الفاج (شكل ٨١).



شكل ٨١: تحضير دنا الفاج M13 من خلايا بكتيرية مصابة من مستعمرات بكتيرية.

الباب السادس

معاملة دنا النقي

معاملــة دنــا النقــى

Manipulation of Purified DNA

بعد إستخلاص دنا يتم معاملته معاملات خاصة حيث يتم قطع الجينات المراد نقلها أى فصلها عن دنا الكلى على هيئة أجزاء صغيرة من دنا محتويــة علــى الجــين أو الجينات المراد نقلها كما يتم أيضاً عمل قطع فى الناقل الوسيط vector فى موقــع أو مواقع خاصة معينة محددة وليست قطع إعتباطى ثم يتم ربط أى لحم أى لصق الجين المراد نقله مع الناقل الوسيط وبذلك يكون الناقــل الوســيط جــاهز لأداء وظيفتــه المطلوبة منه. أى بإختصار لما سبق قطع جزء cutting مطلوب ثم لصقه أى إلتحام تمامًا joining-splicing مع الناقل الوسيط.

جميع الإنزيمات المستعملة فى الهندسة الوراثية والتــى ســيلى ذكرهــا تكــون موجودة فى كائنات حية وتقوم بدورها فـ داخل هذه الكائنات الحية ثم يتم إستخلاص هذه الإنزيمات وتنقيتها وتعبئتها ثم بيعها على نطاق تجارى حيث أن هذه الإنزيمــات هى التى تستعمل فى المعمل فى التجارب المعملية البحتة فى الأنابيب وغيرها. حيــث أن هذه الإنزيمات تقوم طبيعياً فى الخلية بعمليات تضاعف وتكاثر دنــا ونســخ رنــا وترجمة دنا وقطع دنا الغريب أو الغير مطلوب مثال ذلك دنا أو رنا الفيرس الغــازى للخلية أو تصحيح الأخطاء فى جزيىء دنا الناتجة عن الطفرات repair of mutated DNA. ولذلك تقوم بــدورها ذلك أيضــاً فى المعمل فى أنــابيب الإختبار وغيــــرها *in vitro*.

إنزيمات معاملة دنا النقى DNA manipulative enzymes

يمكن تصنيف هذه الإنزيمات إلى خمسة مجاميع تبعاً لطريقة عملها إلى ما يأتى:

١ – نيوكلييزات nucleases: وهى إنزيمــات لقطــع وتقصــير الأحمــاض النوويــة وتحليلها.

٢ – الليجيزات ligases: ربط الأحماض النووية مع بعضها.

٣ - البوليميريزات (إنزيمات البلمرة) polymerases: عمل نسخ من الجزيئات سواء أحماض نووية أو غيرها.

٤ – إنزيمات محورة modifying enzymes: لإزالة أو إضافة مجاميع كيماوية.

٥ – إنزيمات الحلزنة الزائدة topoisomerases: إزالة أو إضافة حلزنة زائدة فى دنا حلقى مغلق.

يلاحظ فى بعض الإنزيمات أنه يمكن أن يقوم الإنزيم بأكثر من وظيفة حيث أن عدد من البوليميريزات تقوم ببناء جزيئات دنا وفى نفس الوقت تقوم بهدم هذه الجزيئات أى تحليلها. يلاحظ أيضاً أنه توجد إنزيمات مماثلة تعمل على رنا ومنها إنزيمات ريبونيوكلييزات RNase.

النيوكلييزات Nucleases

تحلل النيوكلييزات جزيئات دنا وذلك بتكسير الرابطة الثنائية الإسترالفوسفورية phosphor diester bond والتى ترتبط نيوكليوتيد بالذى يليه فى شريط دنا أى جزيىء دنا. ويوجد نوعين من النيوكلييزات وهما:

١ – النيوكلييز الخارجى exonuclease: يزيل النيزكليوتيدات مبتدئاً من طرف الجزيىء.

٢ – النيوكلييز الداخلى endonuclease: يزيل النيوكليوتيدات مبتدئاً من داخل الجزيىء وليست من الأطراف.

يمكن تصنيف إنزيمات النيوكلييزات الخارجية على أساس عدد الأشرطة التى تهاجمها أى تحللها عندما يهاجم (يحلل) الإنزيم جزيىء ثنائى الحلزون. مثال ذلك إنزيم يسمى Ba 131 يتم تنقيته من البكتيريا *Alteromonas espejiana* ويحلل كلا الحلزونين أى الشريطين من كلا الطرفين والعكس صحيح فى حالة إنزيم

exonuclease III الخاص بالبكتيريا إ. كولاى حيث يهاجم أى يحلــل الإنــزيم أحــد الشريطين دون الشريط الآخر من أحد الطرفين حيث أنه يهاجم النهاية ´3 ولا يهاجم النهاية ´5 ولذلك يمكن أن ينتج عن ذلــك جزيـــء أحــادى الحلــزون أى الشــريط ssDNA.

تنطبق نفس القاعدة على إنزيمات النيوكلييزات الداخلية مثــل إنــزيم النيــوكلييز الداخلى (S1 endonuclease) S1 والمستخلص من الفطر *Aspergillus oryzae* سوف يحلل فقط حلزون واحد أى يحلل ssDNA فقط وفى حالــة وجــود nick فــى أحــد الحلزونين فإنه يقوم بكسر الحلزون المقابل لهذا القطع. وفى حالة الإنزيم DNase 1 (deoxyribanuclease 1) والمستخلص من بنكرياس الأبقار يقطع كلا من الحلــزون الأحادى والحلزون الثنائى أى يقطع ssDNA، dsDNA. يعتبر الإنزيم الأخيــر غيــر متخصص من حيث أنه يكسر الجزيىء من أى مكان داخله ونتيجة لذلك يتكون خليط من وحيدات النيوكليوتيدات mononucleotides، وقليلة النيوكليوتيدات القصيرة جــداً very short oligonucleotides والعكس صحيح عما سبق حيث أنه توجــد إنزيمــات تسمى restriction endonucleases وهى تحلل أى تكسر دنا ثنائى الحلزون أى ثنائى الخيط dsDNA أى تفصله إلى أجزاء عديدة. أى يكون القطع فى كلا الحلزونين. لابد أن يكون القطع فى أماكن محــددة at a limited number of specific recognition sites وسوف يتم شرح هذه الإنزيمات بالتفصيل فيما بعد.

الليجيزات Ligases

إنزيم دنا ليجيز DNA ligase لإصلاح وربط ولصق الكسر فى الشريط المفــرد أى الحلزون المفرد والتى تنشأ مثلاً أثناء تضاعف وتكرار دنا. دنا ليجيــز فــى أغلــب الكائنات يمكن أيضاً أن يلحم حلزونين لجزيىء دنا أى لا يكون لصق مفرد بل لصــق مزدوج. وسوف يتم شرح هذا الإنزيم عند شرح دور هذه الإنزيمات فى تكوين دنــا المعاد صياغته recombinant DNA molecules.

البوليميريزات Polymerases

دنا بوليميريز عبارة عن إنزيمات تخلق حلزون جديد أى خيط جديد من دنا تكميلى complementary لدنا موجود فعلاً أو جزيء موجود فعلاً template. أغلب البوليميريزات تعمل فقط عند وجود أصل template له منطقة أى جزء ثنائى الحلزون والتى تعمل كبداية أى البادئ primer وذلك أن البداية أى البادئ لازم لعملية التخليق أى البلمرة (شكل ٨٢).

توجد ثلاثة أنواع من دنا بوليميريز تستخدم روتينيا فى الهندسة الوراثية وهى:

١ – إنزيم DNA polymerase I:

والذى يتم تحضيره من إ. كولاى عادة. هذا الإنزيم يلتصق بمنطقة قصيرة ضيقة وحيدة الحلزون (أى يتصل بقطع nick) فى جزيء دنا ثنائى الحلزون وينتج عن نشاطه جزيء دنا ثنائى الحلزون أى يحدث تكملة وبناء فى المنطقة القصيرة الفارغة gap. وفى هذه الأثناء يحلل الحلزون الموجود فعلاً بداية من منطقة الفجوة أى القطع وأيضاً يبنى حلزون جديد مكانه. أى أن الحلزون المجاور للقطع قد تم تحليله وبناؤه مرة أخرى من جديد. ولذلك يعتبر هذا الإنزيم له نشاط مزدوج dual activity وهو هدم دنا وبلمرة دنا فى نفس الوقت أى DNA polymerization and DNA degradation.

وفى الحقيقة فإن النشاط المزدوج لإنزيم polymerase I حيث أن له نشاط nuclease ونشاط polymerase (شكل ٨٢) وهذين النشاطين يتم التحكم فيهما بواسطة أجزاء خاصة من الإنزيم. نشاط nuclease موجود فى ٣٢٣ حامض أمينى الأوائل أى فى المقدمة من سلسلة عديد الببتيد ولذلك فإن إزالة هذا الجزء ينتج عنه إنزيم محور والذى يكون له نشاط بوليميريز فقط وغير قادر على القيام بهدم دنا أى ليس له نشاط nuclease. يعتبر الأخير إنزيم محور modified enzyme يسمى شظية كليناو أو كسرة كليناو Klenow fragment.

٢ – إنزيم شظية كليناو أو كسرة كليناو Klenow fragment:

تخليق دنا تكميلى cDNA أى complementary DNA على أصل وحيد الحلـزون أى حلزون أى خيط مفرد single-stranded template. وحيث أن هذا الإنزيم ليس له نشاط إنزيم نيوكلييز فإنه يكون غير قادر على النشاط بعد ملىء الفجـوة أو القطـع gap or nick حيث أنه لا يحـلل بقية الحلـزون. أى أن هذا الإنـزيم يمـلأ الفجوة أو القطع فقط فى أحد حلـزونى دنا. أما الأجـزاء بعد الفجوة فتبقى كمـا هـى ولا تغيير ولا تحليل فيها بعكس الإنزيم السابق الذى يهدمها أى يحللها ثم يبينها (شـكل ٨٢). توجد إنزيمات عديدة من البوليميريزات من هذا النوع منها الطبيعـى natural ومنها الصناعى المحور modified أى modified version. يعتبر إنـزيم شـظية كليناو من النوع الثانى. ولهذا الإنزيم أهمية كبيرة فى عمل عمليـة تتابـع دنـا DNA sequencing.

٣ – إنزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase:

وهو المسئول عن تكاثر وتكرارية عديد من أنواع الفيروسات. وهذا الإنزيم فريد فى أنه يستخدم الأصل رنا كأصل RNA template لإنتاج دنا (شكل ٨٢) هذا الإنزيم هام فى الهندسة الوراثية. وهذا الإنزيم ونشاطه هام جداً وكأساس لعملية توطين دنا التكميلى وهى بالإنجليزية cDNA cloning.

الإنزيمات المحورة لدنا

DNA Modifying Enzymes

توجد إنزيمات عديدة من هذا النوع تحور من تركيب دنا وذلك بإضافة أو إزالـة مجاميع معينة وأهمها ما يأتى:

١ – الفوسفاتيز القلوى Alkaline phosphatase:

يتم إستخراجه من إ. كولاى أو الأنسجة المعوية للبقر والذى يقوم بإزالة مجموعة الفوسفات الطرفية الموجودة فى الطرف ´5 لجزيىء 5´ terminus.

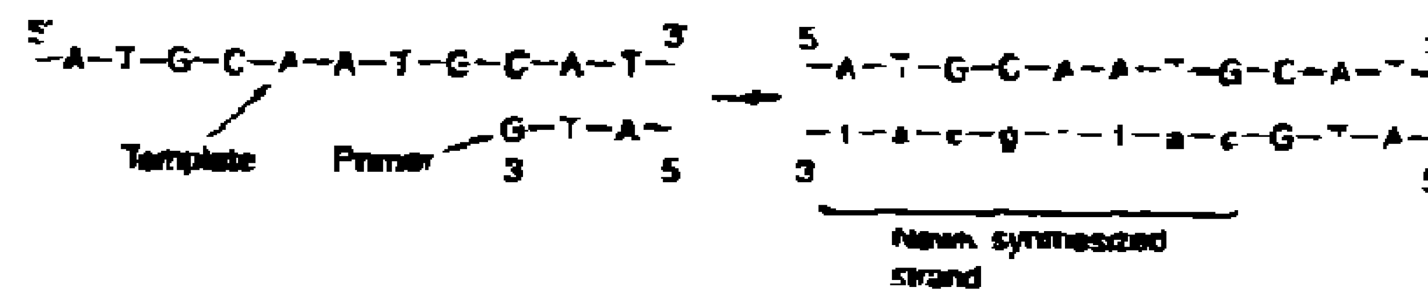
٢ – Polynucleotide kinase:

يستخلص من البكتيريا إ. كولاى المصابة بالفاج T4. وهذا الإنزيم بعكس الإنـزيم السابق حيث أنه يضيف مجموعة فوسفات للنهاية الحرة ´5 أى الطرف ´5.

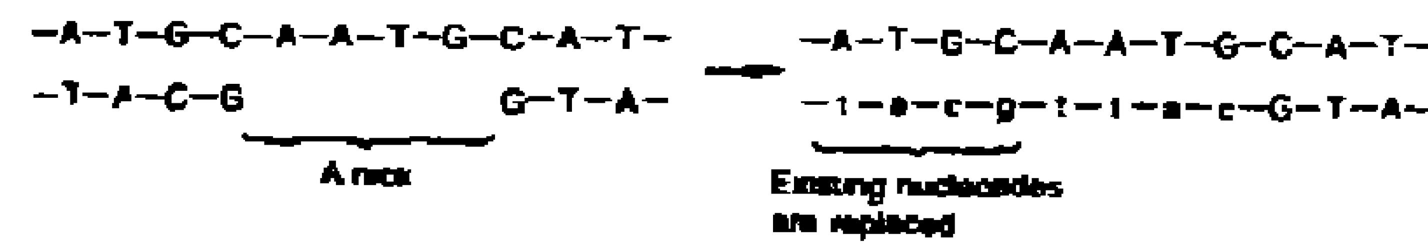
٣ – Terminal deoxynucleotidyl transferase:

يستخلص من نسيج thymus البقر (thymus عبارة عن غدة عديمـة القنـوات توجد فى الرقبة فى الفقاريات والإنسـان بـالطبع وتسـمى بالغـدة التيموسـية أو الصعترية. وهى عادة تصبح أثرية فى الإنسان الناضج أى تصبح أثرية بتقدم السن) ويضيف هذا الإنزيم جزيىء أو أكثر من deoxynucleotides على الطرف ´3 لجزيىء دنا.

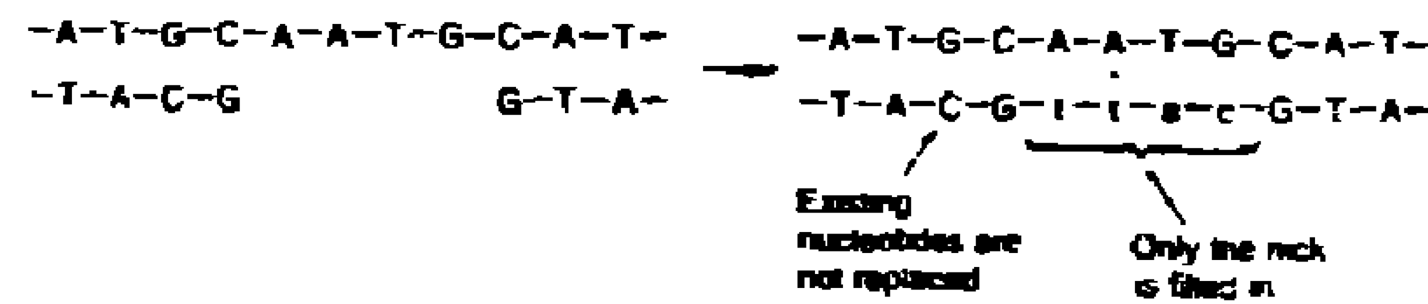
(a) The basic reaction



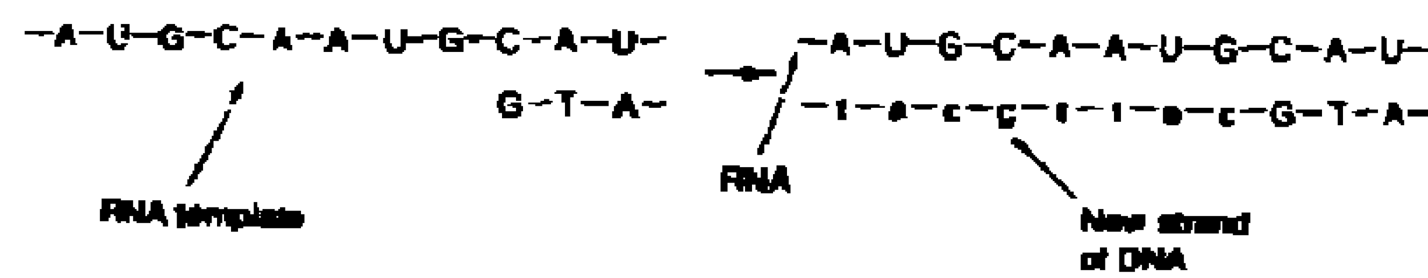
(b) DNA polymerase I



(c) The Klenow fragment



(d) Reverse transcriptase



شكل ٨٢: تفاعـلات وأنشطة إنزيمات البوليميزات، (أ) شريط دنا مخلق من جديد فى الإتجاه من ´5 إلى ´3، (ب) نشـاط بوليميز 1 والذى يملأ الفجوة ثم يحلل ويعيد بنـاء الجزء التالى للفجوة، (جـ) نشاط إنزيم شظية كليناو والذى يملأ الفجوة فقط دون تحليـل وإعادة بناء، (د) نشاط إنزيم النسخ العكسي والذى يستعمل رنا كأصل لبناء جـزيء دنا.

الإنزيمات الحلزنة الزائدة

Topoisomerases

وهى إنزيمات تزيد أو تقلل الحلزنة الزائدة لجزىء دنا الحلقى أى المغلق والذى يسمى الحلقى المغلق التعاونى covalently closed-circular DNA ومثال لذلك جزيئات البلازميدات حيث تؤثر عليها هذه الإنزيمات بشدة من حيث زيادة أو تقليل الحلزنة الزائدة supercoiling. لها دور هام فى دراسة تكرارية أى تكاثر جزيىء دنا ولكن ليس لها دور جوهرى فى الهندسة الوراثية حتى الآن.

إنزيمات قطع دنا الداخلية المشروطة (المحددة)

Restriction Endonucleases

تحتاج عملية توطين الجين هذه الإنزيمات وهى أساسية فى ذلك حيث أنها أولاً لازمة لقطع الجين المطلوب وفصله عن جزيىء دنا الكبير الحجم وبذلك يسهل إدخال الجين المطلوب إلى الناقل الوسيط، لا يمكن إدخال جزيىء كبير للناقل الوسيط، ومثال ذلك أنه يمكن أن يكون الجين المطلوب ٢-٣ كيلو قاعدة kb ومطلوب قطعه وفصله من جزيىء كبير ٨٠ كيلو قاعدة kb. ثانياً أن هذه الإنزيمات لازمة لقطع جزيئات دنا الكبيرة الحجم إلى جزيئات صغيرة الحكم ليمكن حملها بواسطة الناقل الوسيط كما أنها لازمة لقطع الناقل الوسيط الحلقى مثل البلازميد فى مكان واحد فقط وهذا المكان محدد ومتماثل فى البلازميدات، حيث أنه لابد أن يكون مكان محدد بذاته، إذا تم قطع جزيىء الناقل الوسيط إلى أجزاء عديدة نتيجة للقطع فى أكثر من مكان فإن هذا الناقل لا يصلح إطلاقاً لتوطين الجين. الناقل الوسيط يكون به قطع ذو مسافة معينة لإدخال جين معين ومثال ذلك أن الناقل الوسيط M13 يكون غير فعال فى حالة وجود جزيىء دنا أكبر من ٣ كيلو قاعدة kb إذ يكون لكل ناقل وسيط معين كفاءة معينة فى نقل جين معين ذو حجم معين. تم إكتشاف الفائدة العظيمة لهذه الإنزيمات فى توطين

الجين بواسطة علماء W. Arber و H. Smith و D. Nathans وقد نالوا عليها جائزة نوبل عام ١٩٧٨.

كيفية إكتشف هذه الإنزيمات:

أول ملاحظة عن ذلك كانت في بداية الخمسينيات حيث وجد أن بعض سلالات البكتيريا تكون منيعة أى لا تصاب إطلاقاً بالفاج وتسمى هذه الظاهرة host-controlled restriction وقد إستغرق تعليل هذه الظاهرة حوالى عشرون عاماً أو يزيد. حيث أن هذه الإنزيمات توجد فى البكتيريا والتى تسبب تحليل دنا الفاج قبل تكراره أى قبل تخليق جزيئات فاج جديدة. يكون دنا خلية البكتيريا نفسه منيع ضد هذا الإنزيم لأنه يحتوى على مجاميع ميثيل إضافية تمنع عمل هذه الإنزيمات، وبذلك تقى دنا الخاص بها من التحليل. يتم تخليق هذه الإنزيمات فى جميع البكتيريا أو أغلبها وقد أمكن التعرف على أكثر من ١٢٠٠ نوع من هذه الإنزيمات. يمكن تصنيف هذه الإنزيمات إلى ثلاثة مجاميع أو طرز تبعاً إلى طريقة أو آلية أداء عملها mode of action، وهذه الطرز هى طراز I وطراز II وطراز III. الطرازين I، III معقدين جداً ولهما إستعمال محدود فى الهندسة الوراثية. ولكن الطراز II يشمل هذه الإنزيمات والتى تستخدم فى الهندسة الوراثية بكثرة وأيضاً فى توطين الجين.

إنزيمات الطراز II وهى التى تقطع دنا فى تتابع معين:

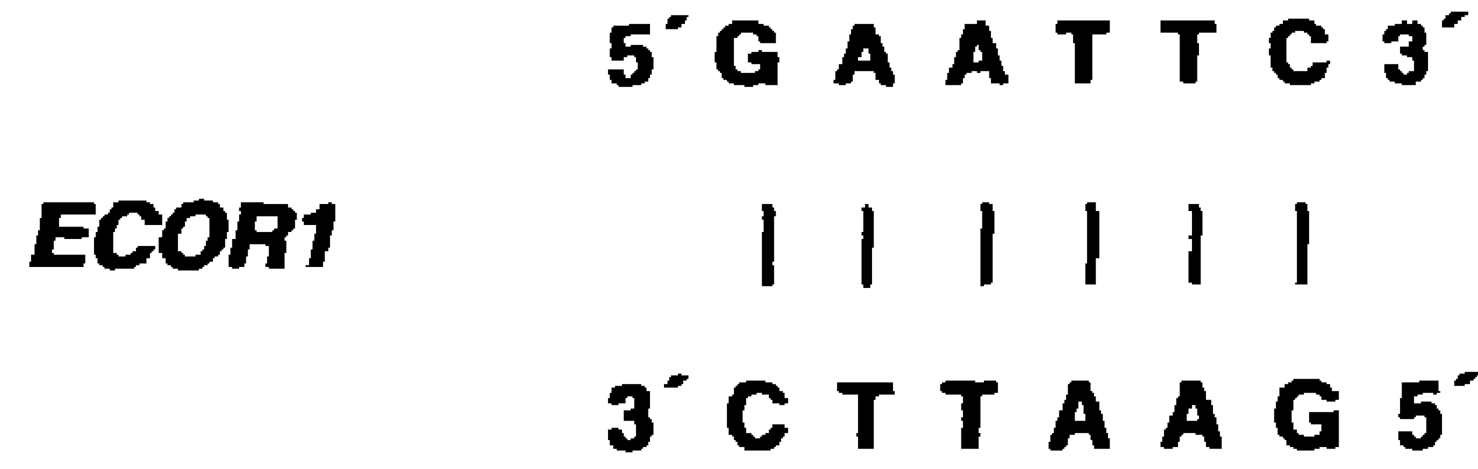
Type II restriction rndonucleases cut DNA at specific nucleotide sequence:

صفة أساسية لهذه الإنزيمات أن كل إنزيم له تتابع قواعد معينة عنده يقطع جزيىء دنا (عند الحديث عن هذه الإنزيمات سنسميها إنزيمات القطع المشروطة فقط ولكن ليعلم القارئ أنها تتبع الطراز II ولن نذكر ذلك فى كل مرة للإختصار). مثال ذلك أن *PvuI* I المعزول من البكتيريا *Proteus vulgaris* يقطع دنا فقط عند التتابع لستة قواعد نيوكليوتيدات أى يكون التتابع محدد لستة قواعد معينة نيوكليوتيدات

وهى C ثم G ثم A ثم T ثم C ثم G إلى CGATCG. والعكس صحيح فى حالة إنزيم آخر مستخلص من نفس البكتيريا يسمى *PvuI* II يقطع تتابع آخر مختلف لستة قواعد نيوكليوتيد وهو C ثم A ثم G ثم C ثم T ثم G أى التتابع CAGCTG. كثير من هذه الإنزيمات تتعرف على تتابع مكون من ستة نيوكليوتيدات كما سبق شرحه ولكن البعض الآخر يتعرف على تتابع قواعد مكون من ٤ قواعد أى ٤ نيوكليوتيدات والبعض الآخر يتعرف على تتابع مكون من ٥ نيوكليوتيدات والبعض الآخر يتعرف على تتابع مكون من ٨ نيوكليوتيدات وهكذا. إنزيمات إستخرجت من البكتيريا *Staphylococcus aureus* السلالة رقم ٣ A ويسمى الإنزيم *S au* 3A يتعرف على تتابع أربعة نيوكليوتيدات GATC أى G ثم A ثم T ثم C.

إنزيم آخر يسمى *Alu* I يستخرج من البكتيريا *Arthrobacter luteus* والذى يقطع تتابع أربعة نيوكليوتيدات وهى AGCT أى A ثم G ثم C ثم T. توجد أمثلة أخرى لإنزيمات أقل فى حساسيتها للتعرف على تتابع معين أى أنها أقل حساسية فى التعرف على تتابع القواعد وتسمى هذه الإنزيمات بالإنجليزية degenerate recognition sequences حيث أنها تتعرف على عائلة من تتابع القواعد المتشابهة family of related sites أى نفس العدد من القواعد ولكن فى تباديل وتوافيق فى ترتيب هذه القواعد ومثال ذلك الإنزيمات المسماه *HinfI* المستخرجة من البكتيريا *Haemophilus influenza Rf* السلالة Rf وهى تتعرف على عديد من تتابع القواعد وهى GANTC، GAATC، GATTC، GAGTC، GACTC.

وفيما يلى جدول لبعض هذه التتابعات من القواعد والتى تقطعها بعض الإنزيمات المشهورة والمستعملة بكثرة فى توطين الجين والهندسة الوراثية (جدول ٥) تتابع القواعد يكون ترتيبه فى الإتجاه ´5 إلى ´3 فى خيط أو حلزون واحد أى أول حرف من الشمال فى التتابع يكون ناحية الطرف ´5 وآخر حرف فى اليمين يكون ناحية الطرف ´3. لاحظ أن الحلزون الثانى يكون مكمل له تماماً ويكون فى الإتجاه العكسى ´3 إلى ´5 كما فى الشكل (شكل ٨٣).



شكل ٨٣: يوضح ترتيب القواعد فى حلزون مفرد (العلوى) ويكـون مـن 5´ إلى 3´ وعكسه أى الحلزون الثانى المكمل (السفلى) يكون ترتيب القواعد معكوس تماماً ويكون فى الإتجاه 5´ إلى 3´ وذلك توضح القواعد عمل إنزيم *EcoR1*.

جدول ٨٥: تتابع القواعد لبعض إنزيمات القطع الداخلية المشروطة (r.e) المستعملة بكثرة (التتابع المكتوب فى الجدول من الإتجاه 5´ إلى 3´).

Enzyme	Organism	Recognition Sequence	Blunt or Sticky end
EcoR I	Escherichia coli	GAATTC	Sticky
BamHI	Bacillus amyloiquefaciens	GGATCC	Sticky
Bgl II	Bacillus globigii	AGATCT	Sticky
Pvu I	Proteus vulgaris	CGATCG	Sticky
Ovu II	Proteus vulgaris	CAGCTG	blunt
Hind III	Haemophilus influenzaeRd	AAGCTT	Sticky
Hinf I	Haemophilus influenzaeRf	GANTC	Sticky
Sau 3A	Staphylococcus aureus	GATC	Sticky
Alu I	Arthrobacter luteus	AGCT	blunt
Taq I	Thermus aquaticus	TCGA	Sticky
Hae III	Haemophilus aegyptius	GGCC	blunt
Not I	Nocardia otitidis-caviarum	GCGGCCGC	Sticky

النهايات المستوية والنهايات اللزجة Blunt and sticky ends:

بعض إنزيمات القطع الداخلية المشروطة (r.e) تحدث قطع بسيط فى حلزونى دنا فى منطقة واحدة يكون القطع فى منطقة فى منتصف تتابع القواعد. يكون القطع فـى كلا الحلزونين على إستقامة واحدة أى كخط مسـتقيم وتسـمى الأطـراف الناتجـة

بالأطــراف المستوية blunt end أو flush end ومن أمثلة ذلــك الإنزيمــات *Alu* I. *Pvu* II. ولكن يوجد عدد كبير من إنزيمات القطع الداخلية المشــروطة (r.e) تقطــع حلزونى دنا فى منطقتين مختلفتين داخل تتابع القواعد الخاصة بالإنزيم أى القطــع لا يكون على إستقامة واحدة فى كلا حلزونى دنا أى يقطع أحد حلزونى دنا فى منطقــة ويقطع الجلزون الآخر فى منطقة معينة بعيدة عن قطع الحلزون الأول وفــى داخــل تتابع القواعد الخاص بالإنزيم ولذلك تكون نهاية القطع غير مستوية بــل مشرشــرة لمسافة إثنين إلى أربعة قواعد أو نيوكليوتيدات عادة وتسمى الأطراف فى هذه الحالة بالأطراف اللزجة sticky or cohesive ends سميت كذلك لأنها عنــد تقاربهــا مــن بعضها تلتصق ببعضها بسهولة مرة أخرى وتصبح سليمة كأن شئ لم يكــن. حيــث تتقابل القواعد المفردة المتوافقة وجهاً لوجه ويحدث الإرتباط بينهما مرة أخرى.

أحد الصفات الهامة فى ذلك أن إنزيمات القطع الداخلية المشــــروطة المختلفــة يمكن أن ينتج عن أكثر من واحد من هذه الإنزيمات نفس الطرف اللزج ومثال ذلــك أن الإنزيم *Bam* HI يكون التتابع الخاص بــه CGATCC والإنــزيم *Bgl* II يكــون التتابع الخاص به AGATCT وكلاهما ينتج الطرف اللزج GATC أى نفس الطــرف اللزج. علاوة على ذلك وجد أن الإنزيم *Sau* 3A يتعرف على تتابع القواعد الربــاعى GATC (tetranucleotide) والذى يقطعها من الطــرفين أحــد القطعــين فــى أحــد الحلزونين قبل G والقطع الآخر فى الحلزون الآخر قبل G أيضاً وهكذا يكون الطرف اللزج هو GATC فى كلا الحلزونين.

مما سبق يتضح أن GATC نتجت من نشاط ثلاثة إنزيمات مختلفة، وممــا هــو جدير بالذكر أن هذه الأطراف اللزجة الناتجة من الإنزيمات المختلفة يمكن أن تلــتحم مع بعضها عند خلطها مع بعضها لأنها مكملة لبعضها، وحيث تلتحم الأطراف اللزجة مع بعضها، دون تمييز لتركيب دنا الأصلى والذى يختلف فى التركيب ولــذلك تعمــل عليه إنزيمات مختلفة، ولكن الأطراف اللزجة متوافقة فى الحالات الثلاثــة الســابقة وتلتحم مع بعضها عند خلطها.

تكرارية تتابع القواعد المعينة (ذات الترتيب المعين) فى جزيىء دنا

The frequency of recognition sequences in a DNA molecule

عدد تكرارية تتابع القواعد المعينة recognition sequences التى يتعرف عليها إنزيم القطع الداخلى المشروط فى جزيىء دنا معروف الطول يمكن حسابها ولو نظرياً.

أولاً وبادئ ذى بدء إفتراض أن القواعد أى النيوكليوتيدات موزعة بطريقة عشوائية وأن الأربعة قواعد المختلفة موجودة بنسب متساوية. ولذلك فإن تتابع أربعة قواعد وهى مثلاً GATC لابد أن تحدث مرة فقط كل $٤^{٤}$ = ٢٥٦ نيوكليوتيدة وتتابع ستة قواعد مثلاً GGATCC تكون مرة فقط كل $٤^{٦}$ = ٤٠٩٦ نيوكليوتيدة وهكذا إذا كان خمسة قواعد يكون مرة فقط كل $٤^{٥}$ نيوكليوتيدة وهكذا مرة كل $٤^{٣}$ أو $٤^{٧}$ وهكذا. عملياً لا تكون هذه الإفتراضات صحيحة تماماً. مثال ذلك أن دنا فى الفاج لامدا وله حوالى ٤٩ كيلو قاعدة (kb) لابد وأن يحتوى على حوالى ١٢ موقع قطع لإنزيم القطع الداخلى المشروط والذى له تتابع قواعد مكون من ستة قواعد أى ستة نيوكليوتيدات. ولكن فى الحقيقة أن مواقع القطع والتعرف أقل من ١٢ موقع. ومثال ذلك إستخدمنا تتابع قواعد معينة للقطع عدد القواعد فيها ستة وذلك بالنسبة لإنزيمات *Bgl* II، *Bam* HI، *Sal* I حيث أنها تعمل على قواعد عدده ستة. المفروض يوجد ١٢ موقع قطع لكل إنزيم ولكن فى الطبيعة وعملياً وجد أن مواقع القطع أقل بكثير فهى ستة مواقع قطع لإنزيم *Bgl* II وخمس مواقع قطع لإنزيم *Bam* HI وموقعين للقطع فقط فى حالة *Sal* I. وهذا يفسر بأن نسب القواعد بعضها إلى البعض غير متساوية فى حالة دنا الفاج لامدا حيث من المفروض أن يكون محتوى دنا للفاج من القاعدتين GC يساوى ٥٠% ولكن النتائج العملية توضح أن محتوى دنا للفاج من القاعدتين GC أقل من ٥٠%.

أكثر من ذلك أن هضم دنا الفاج لامدا بكل من الإنزيمات الثلاثة السابق ذكرها المفروض أنه يعطى أجزاء أى شظايا تقريباً متساوية فى حجمها، كل إنزيم يعطى

أجزاء متساوية فى حجمها نتيجة الهضم. ولكن العكس صحيح عملياً (شكل ٨٤) حيث وجد أن ناتج كل إنزيم أعطى أجزاء أى شظايا من دنا مختلفة الأحجام تماماً وتعليل ذلك أن هذه القواعد أى النيوكليوتيدات غير مرتبة إعتباطياً أى غير موزعة عشوائياً are not randomly ordered كما سبق إفتراضه.

مما سبق يتضح أن الحساب النظرى رياضياً يعطى فكرة عن عدد مواقع القطع ولكن التجارب العملية هى الأساس ولا يعتمد على الحساب النظرى إطلاقاً.

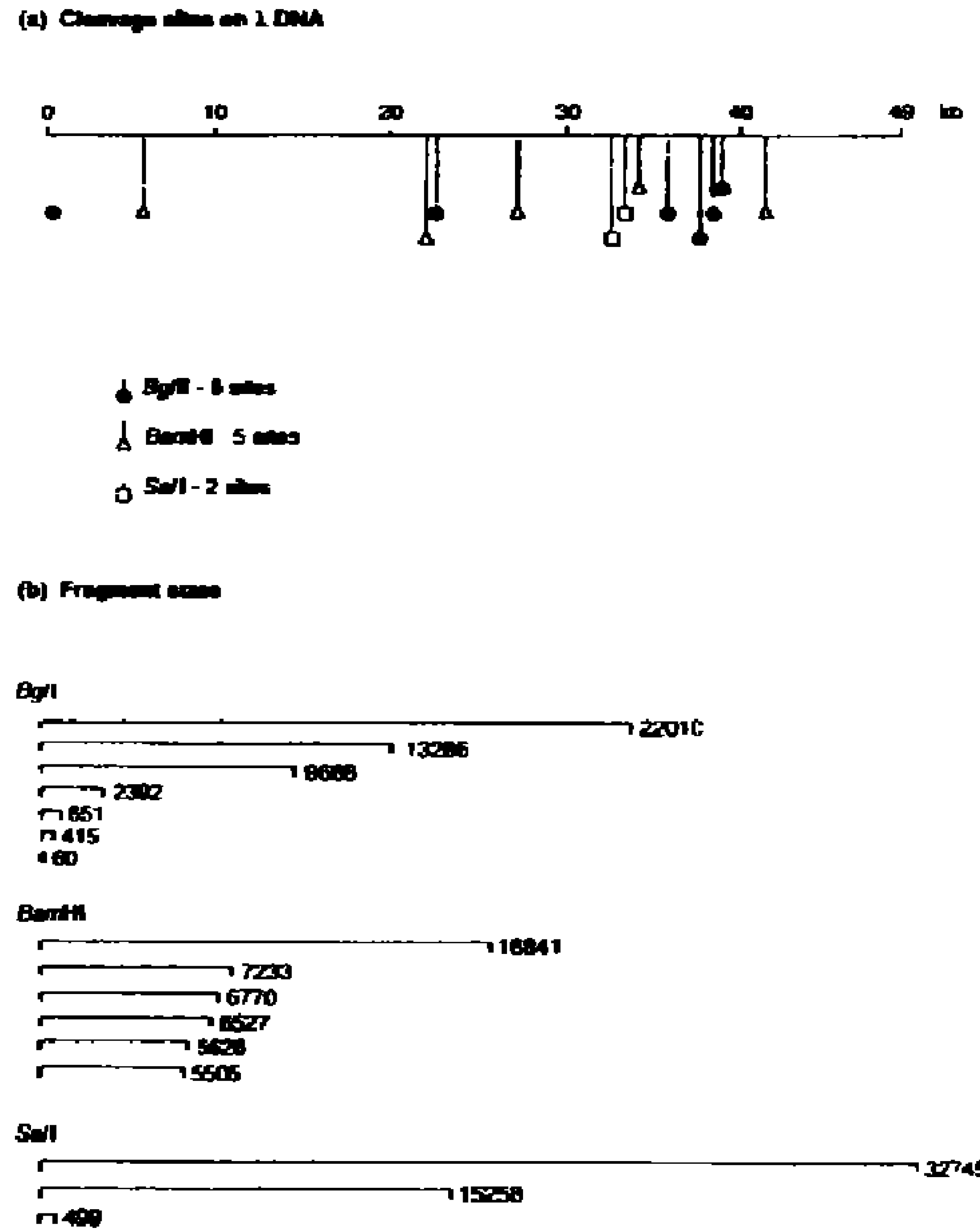
عمل هضم بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة أى المحددة (r.e) فى المعمل

Performing a restriction digest in the laboratory

مثال لكيفية هضم عينة دنا لامدا بتركيز ١٢٥ ميكروجرام/مل بواسطة إنزيم القطع *Bgl* II. يتم تنقيط كمية دنا الملطوبة بواسطة ماصة فى إنبوبة إختبار. حجم كمية دنا المطلوب تحليلها تعتمد على طبيعة التجربة، وفى هذه الحالة مطلوب هضم أى تحليل ٢ ميكروجرام من دنا لامدا والموجودة فى ١٦ ميكرولتر من العينة، نحتاج فى ذلك إلى ماصات شديدة الدقة. يجب الحصول على إنزيمات القطع الداخلية المشروطة وهى عامة تباع تجارياً وتكون على هيئة محلول نقى معروف التركيز. يجب ضبط رقم pH البيئة المناسب لنشاط الإنزيم وهو ٧,٤، وعامة أغلب إنزيمات القطع (التحليل) الداخلى المشروط تكون فى قمة نشاطها فى pH ٧,٤.

تختلف هذه الإنزيمات فى إحتياجاتها للقوة الأيونية ionic strength والتى يمكن عملها بواسطة كلوريد الصوديوم عادة وأيضاً تختلف فى مدى أو درجة إحتياجها لكاتيون الماغنيسيوم. جميع إنزيمات الطراز II من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة تحتاج كاتيون الماغنيسيوم لنشاطها. من المطلوب ومن المفيد إضافة عامل مختزل مثل dithiothreitol حيث أن يسبب ثبات الإنزيم ويمنع تثبيطه. وجد أن التركيز الغير مناسب م ص كل والماغنيسيوم يسبب تقليل نشاط الإنزيم وعلاوة على

ذلك قد يؤثر على تخصص الإنزيم ويعمل فى قطـــع أمـــاكن أخـــرى إضـــافية غيـــر المخصصة له حيث تكون أماكن إضافية لا يقوم الإنزيم بقطع هذه الأماكن فى الحالة العادية. يتضح مما سبق أن المحلول المنظم المناسب لإنزيم *Bgl* II هـــو مـــا يـــأتى (جدول ٦).



شكل ٨٤: قطع جزيء دنا الفاج لامدا بإنزيمات القطع الداخلية المشروطة، (أ) أماكن القطع علمياً للإنزيمات *Bgl* II (ستة)، *Bam* HI (خمسة)، *Sal* I (إثـــنين)، (ب) أحجـــام الشظايا المختلفة نتيجة لنشاط الإنزيمات السابقة (الأرقام تدل على حجم الشظية مقـــدرا بواسطة أزواج القواعد base-pairs).

جدول ٦: المحلو المنظم المناسب لإنزيم *Bgl* II.

المركب	التركيز (ملليمول mM)
Tris-HCL, pH 7.4	٥٠٠
كلوريد مغنيسيوم $MgCl_2$	١٠٠
كلوريد صوديوم	٥٠٠
dithiothreitol	١٠

هذا التركيز يكون عشرة أضعاف التركيز المستعمل ولذلك يتم تخفيف هذا المحلول المنظم عند إضافته لمخلوط التفاعل بعد ذلك يتم إضافة إنزيم القطع الداخلى المشروط. الوحدة من الإنزيم (1 unit) يمكن تعريفها أنها عبارة عن الكمية التى نحتاجها من الإنزيم لقطع ١ ميكروجرام من دنا فى الساعة وهكذا. ولذلك فإننا نحتاج وحدتين من *Bgl* II لقطع ٢ ميكروجرام من دنا لامدا فى الساعة. عادة يمكن الحصول على الإنزيم *Bgl* II بتركيز ٤ وحدة لكل ميكرولتر، ولذلك فى الحالة السابقة فإنه يلزم ١/٢ ميكرولتر لقطع دنا وتخفيفها بالماء بواسطة ١,٥ ميكرولتر فيصبح المجموع ٢ ميكرولتر.

وهكذا فإن المحلول النهائى حجمه يكون ٢٠ ميكرولتر وهو عبارة عن ٢ ميكرولتر محلول منظم (الأساسى أى الأصلى الذى قوته ١٠ X) و ١٦ ميكرولتر دنا العينة و ٢ ميكرولتر من الإنزيم (١/٢ ميكرولتر) المخفف بالماء (١/٥ ميكرولتر).

آخر الظروف البيئة اللازمة لنشاط الإنزيم هى درجة حرارة التفاعل أى درجة حرارة التحضين. من المعروف أن درجة التفاعل المثلى لغالبية إنزيمات القطع الداخلى المشروط ومنها *Bgl* II هى ٣٧ درجة مئوية. ولكن لهذه القاعدة إستثناءات ومنها إنزيم *Tag* I والذى يستخلص وينقى من البكتيريا *Thermus aquaticus* والتى تعيش فى بيئة درجة حرارتها مرتفعة مثل الينابيع الحارة. فعند إجراء التجارب بهذا

الإنزيم يجب أن تكون درجة حرارة تحضين مخلوط التفاعل هى ٦٥ درجة مئوية وهى درجة الحرارة المثلى لنشاط الإنزيم.

بعد ساعة ينتهى التفاعل وتصبح أجزاء أى كسورات أى شظايا دنا قابلة للإستعمال فى تجارب التوطين للجينات. لابد التخلص حالاً من الإنزيم الذى قد يعمل عند إضافة دنا أثناء التجارب التالية ويكون ذلك بتسخين المحلول إلى درجة ٧٠ درجة مئوية لفترة قصيرة أو إستخلاص بالفينول أو إضافة مركب EDTA حيث أن الأخير يقوم بخلب أيونات المغنيسيوم ويمنع ذلك نشاط الإنزيم.

تحليل نتائج القطع (التحليل) بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة أو المحددة:

Analysing the result of restriction endonuclease cleavage:

يجب تحديد عدد وطول الشظايا الناتجة عن القطع. يمكن معرفة حدوث القطع (التحليل) من عدمه وذلك بقياس اللزوجة بواسطة جهاز قياس اللزوجة **viscometer**. حيث أن جزيئات كبيرة تسبب لزوجة عالية والعكس صحيح. ولكن الطريقة المثلى لتحديد عدد وطول الشظايا هى إستعمال هجرة الجزيئات فى وسط غروى وفى مجال كهربائى وتسمى هذه الطريقة **electrophoresis**.

أ – فصل الجزيئات (الشظايا) بواسطة الهجرة فى مجال غروى فى وسط كهربائى Seperation of molecules by gel electrophoresis:

جزيئات دنا تحمل شحنة سالبة ولذلك عند وضعها فى مجال كهربائى فإنها تهاجر ناحية القطب الموجب. درجة سرعة الهجرة للجزيىء تتوقف على عاملين شكله والعامل الثانى النسبة بين الشحنة والوزن **charge to mass ratio**. لسوء الحظ أغلب جزيئات دنا تكون متماثلة فى الشكل وتكون متشابهة فى نسبة الشحنة إلى الوزن. ولذلك فإن الشظايا المختلفة الحجم لا يمكن فصلها بواسطة الهجرة فى مجال كهربائى. ولكن يصبح لحجم الجزيىء تأثير إذا إستخدمنا وسط غروى ومجال كهربائى. ومثال للغرويات **gels** المستعملة الأجاروز **agarose** والبولى أكريل أميد

polyacrylamide، يمكن إستخدام كل منهما على حدة أو إستخدام خليط منهما وذلك للتحكم فى درجة المسامية المطلوبة للفصل أثناء هجرة الجزيئات. الجزيئات الأصغر حجماً تهاجر بسرعة أكبر من الجزيئات الأكبر حجماً. وهكذا فإن gel الغروى يفصل الجزيئات تبعاً لحجمها فى gel electrophoresis.

تركيب الـ gel هو الذى يحدد حجم الجزيئات دنا المفصولة. ففى حالة الأجاروز عندما يكون سمك الـ slab الطبقة سميكة (سمكها ١/٢ سم) وتتكون من ٠,٥% أجاروز يكون بها ثقوب واسعة نسبياً وتستخدم فى فصل جزيئات حجمها يتراوح من ١ إلى ٣٠ كيلو قاعدة kb، ومثال ذلك أن جزيئات دنا ذات الحجم ١٠-١٢ كيلو قاعدة يمكن أن تنفصل بسهولة عن بعضها ويمكن تمييزها بسهولة. وفى حالة وجود طبقة رقيقة جداً سمكها ٠,٣ مم وتتكون من ٤٠% بولى أكريل أميد gel فإنها تكون ذات ثقوب صغيرة جداً نسبياً وتستخدم فى فصل جزيئات دنا صغيرة الحجم والتى تتراوح فى أحجامها من ١ إلى ٣٠٠ زوج قواعد bp وتكون من الدقة بحيث أنها تفصل إختلاف فى أطوال عديد النيوكليوتيدات بدرجة زيادة أو نقص نيوكليوتيدة فى الطول فقط، أى درجة عالية من دقة الفصل والتميز.

ب – التعرف على دنا فى الجل Visualizing DNA molecules in a gel:

يمكن التعرف على دنا فى الجل بالصبغ أو بإستخدام autoradiography

١ – الصبغ: لتوضيح جزيئات دنا المفصولة على الجل لابد من صبغها بصبغة مناسبة لتسبب وضوح جزيئات دنا مثل بروميد الإيثيديم ثم تعريض الجل إلى الأشعة فوق البنفسجية حيث يمكن رؤية أشرطة bands جزيئات دنا المفصولة. يستخدم بروميد الإيثيديم للصبغ فى كلا الحالاتين بإستخدام الأجاروز أو إستخدام البولى إكريل أميد. يمكن رؤية أشرطة جزيئات دنا منفصلة تماماً فى وجود الأشعة فوق البنفسجية بشرط وجود كميات أى تركيز كاف من جزيئات دنا، فى حالة التركيزات المنخفضة جداً يصعب رؤية الشرائط.

٢ – Autoradiography: أحد مساوئ الصبغ بواسطة بروميد الإيثيديم أن حساسيته محدودة، ففى حالة وجود تركيزات أقل من حوالى ٢٥٠ نانوجرام من دنا للشريط الواحد فإن حساسيته تكون ضعيفة جداً وتصبح طريقة الصبغ غير فعالة فى تمييز الشرائط. ولذلك لابد من وجود طريقة أخرى أكثر حساسية وهى طريقة autoradiography. وفيها يتم تعليم دنا قبل الفصل بواسطة .e.ph وذلك بربط الجزيئات بمعلمات (دلالات) مشعة radioactive markers وبذلك يمكن رؤية أى تصوير دنا بوضع فيلم فوتوغرافى حساس (فيلم تصوير) لأشعة X أعلى الـ gel أى أعلى الـ slab سيصور حزم دنا، وتظهر حزم دنا بلون غامق مسود. عملية إدخال المعلمات أى الدالالات المشعة هى عبارة عن إدخال نيوكليوتيدات تحتوى على فوسفور مشع من نوع فو٣٢ إلى جزيئات دنا ويكون ذلك بطرق عديدة أفضلها طريقة تسمى ترجمة القطع وطريقة أخرى تسمى طريقة ملأ النهاية nick translation and end filling.

طريقة ترجمة القطع تشير إلى نشاط إنزيم بلمرة دنا رقم I (DNA polymerase I) أغلب عينات دنا النقية تحتوى بعض الجزيئات المقطوعة، ويتوقف ذلك على درجة كفاءة عمل هذه التحضيرات، فكلما كان التحضير جيد وتم تحضيره بدقة فإن هذا الإنزيم سيكون له القدرة الكبيرة على الإلتحام وأيضاً تخليق شريط من دنا يحتاج هذا التفاعل إلى مدد من النيوكليوتيدات باستمرار وإذا كانت واحدة من هذه النيوكليوتيدات مشعة فإن جزيىء دنا المتكون يكون مشع أيضاً. هذه الطريقة يمكن أن تستخدم لتعليم جزيىء دنا ولكن فى بعض الظروف تسبب إنشقاق الجزيىء دنا DNA cleavage.

طريقة ملأ النهاية end-filling تعتبر طريقة أفضل من السابقة لأنها أكثر دقة رقة a gentler method فهى نادراً ما تسبب إنشقاق جزيىء دنا ولكن من عيوبها أنه لا يمكن تطبيقها إلا فى حالة الأطراف اللزجة لجزيئات دنا يستخدم فى هذه الحالة إنزيم شظية كليناو klenow fragment والذى يسبب ملأ النهايات للزجة لجزيئات دنا وذلك

بتخليق شريط تكميلى. وإذا تم ملأ النهايات بواسطة نيوكليوتيدات مشعة فإنه جزيىء دنا المتكون يصبح مشع.

كلا الطريقتين السابقتين ينتج عنهما جزيئات دنا مشعة وحتى لــو كــان تركيــز جزيئات دنا قليل جداً فإن طريقة autoradiography يمكنها التعرف على وجود حزم جزيئات دنا فى الجل gel. فإنه فى حالة وجود تركيز حزيئات دنا منخفض، حوالى ٢ نانوجرام من دنا لكل حزمة، فإنه يمكن تصويرها ورؤيتها فى الظروف المثالية.

تقدير حجم جزيئات دنا Estimation of sizes of DNA molecules:

فى حالة gel e. ph. فإن جزيئات دنا تنفصل فى الجل تبعاً لأحجام جزيئــات دنــا المختلفة، فإن الأحجام الصغيرة تهاجر بسرعة نحو القطب الموجب وتقطــع مســافة طويلة نسبياً والعكس صحيح فى الجزيئات الكبيرة حيــث ســتقطع مســافة قصــيرة وهكذا. نتيجة للقطع ستتكون أحجام مختلفة من جزيئات دنــا ســتهاجر فــى الجــل بسرعات مختلفة ولذلك سننتج لدينا عدد من الحزم المتتابعة فى الجل الواحد ويلــزم تقدير أحجام هذه الجزيئات فى الحزم المختلفة. توجد طرق لتقدير هذه الأحجام ولكن أدق هذه الطرق هى عمل حسابات لربط العلاقة بين سرعة الهجرة فى الجل وحجــم الجزيىء وهذه يمكن حسابها من المعادلة الآتية:

$$D = a - b (\log M)$$

حيث أن:

D هى مسافة الهجرة.

M هى الوزن الجزيىء لدنا.

b,a ثوابت تتوقف على حالة وظروف e. ph.

توجد طريقة أخرى تستخدم بكثرة ولكنها أقل دقة من الطريقة السابقة فى تقــدير حجم جزيئات دنا. وملخص هذه الطريقة أنه يتم عمل هضم أى تحليل لجزيئات دنــا بواسطة إنزيمات القطع الداخلية المشروطة ويكون ذلك كأساس للمقارنة standard

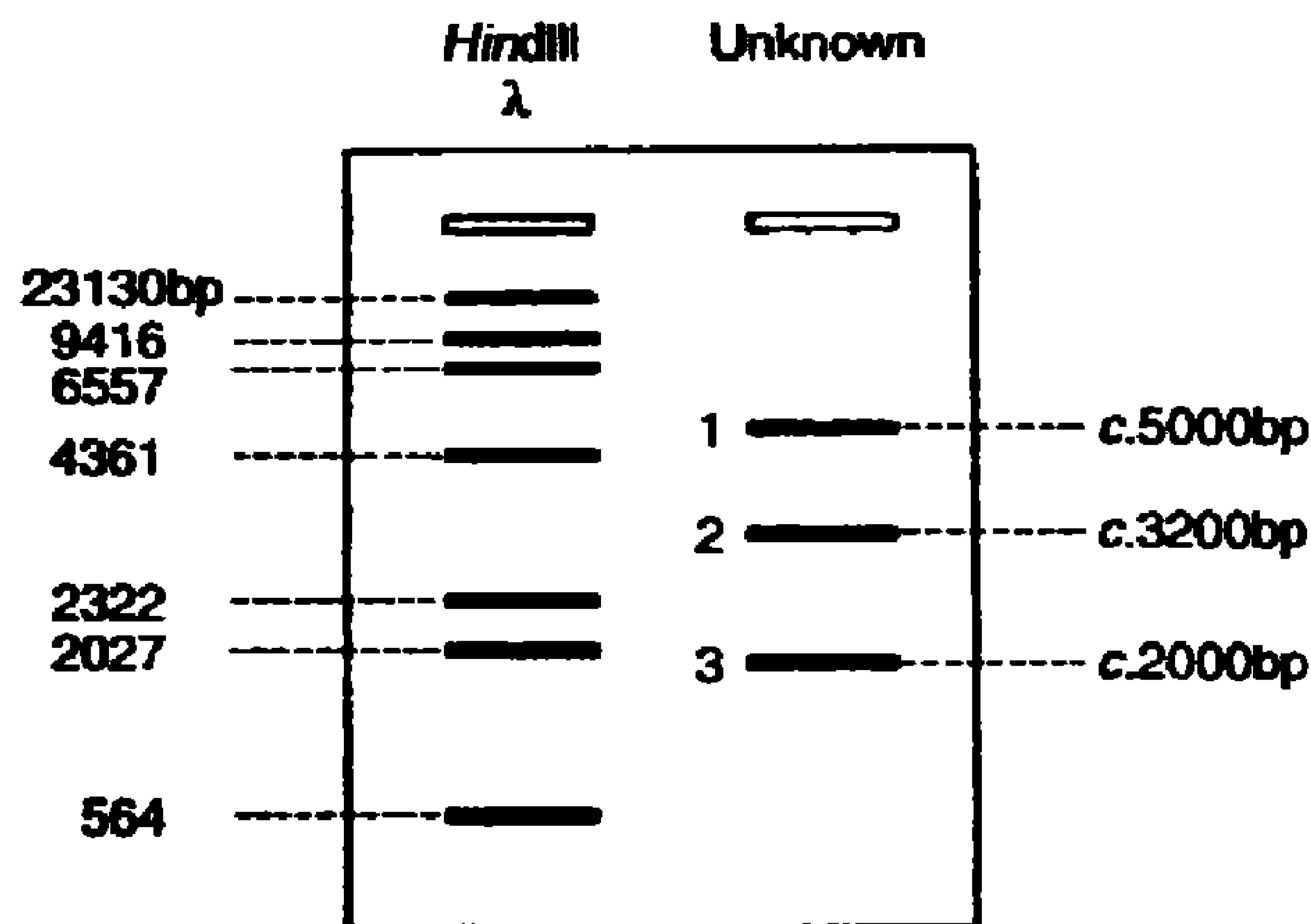
restriction digest، وفيها يتم عمل هجرة لجزيئات معروفة الحجم فى نفس الجـل. وهكذا عند كل إختبار قطع يتم وضع هذه الجزيئات المعروفة الحجم كأساس للمقارنة فى الجل. هضم أى تحليل دنا الفاج لامدا يستخدم عادة فى هـذه الطريقـة كأسـاس للمقارنة لحجم الجزيئات size markers. ومثال ذلك أن الإنزيم *Hind* II يسبب قطـع دنا الفاج لامدا إلى ثمانية أجزاء أو شظايا تتراوح أحجامها من ١٢٥ زوج قاعدة pb وهى الصغيرة الحجم إلى ٢٥ كيلو قاعدة kb وهى الأكبر. وحيث أن أحجام الشـظايا فى هذا التحليل معروف، فإن أحجام الشظايا فى العينة المختبـرة يمكـن معرفتهـا بمقارنة مسافة الهجرة فى العينة المعروفة والعينة المختبرة وذلك بمقارنـة موقـع الحزم فى العينة وموقع الحزم فى العينة المعروفة الخاصة بدنا الفـاج (شـكل ٨٥) يمكن مقارنة الموقع وتقدير الحجم التقريبى بواسطة العين المجردة. ولكن الطريقـة الأدق هى عمل منحنى قياسى standard curve للعينة المعروفة وذلك بوضع مسافة الهجرة على المنحنى السينى وحجم شظية دنا على المنحنـى الصـادى ثـم نقـيس المسافات فى العينة المختبرة ونوقعها على المنحنى ومنها نتعرف على حجم الشظايا الخاصة بالعينة المجهولة أى المختبرة.

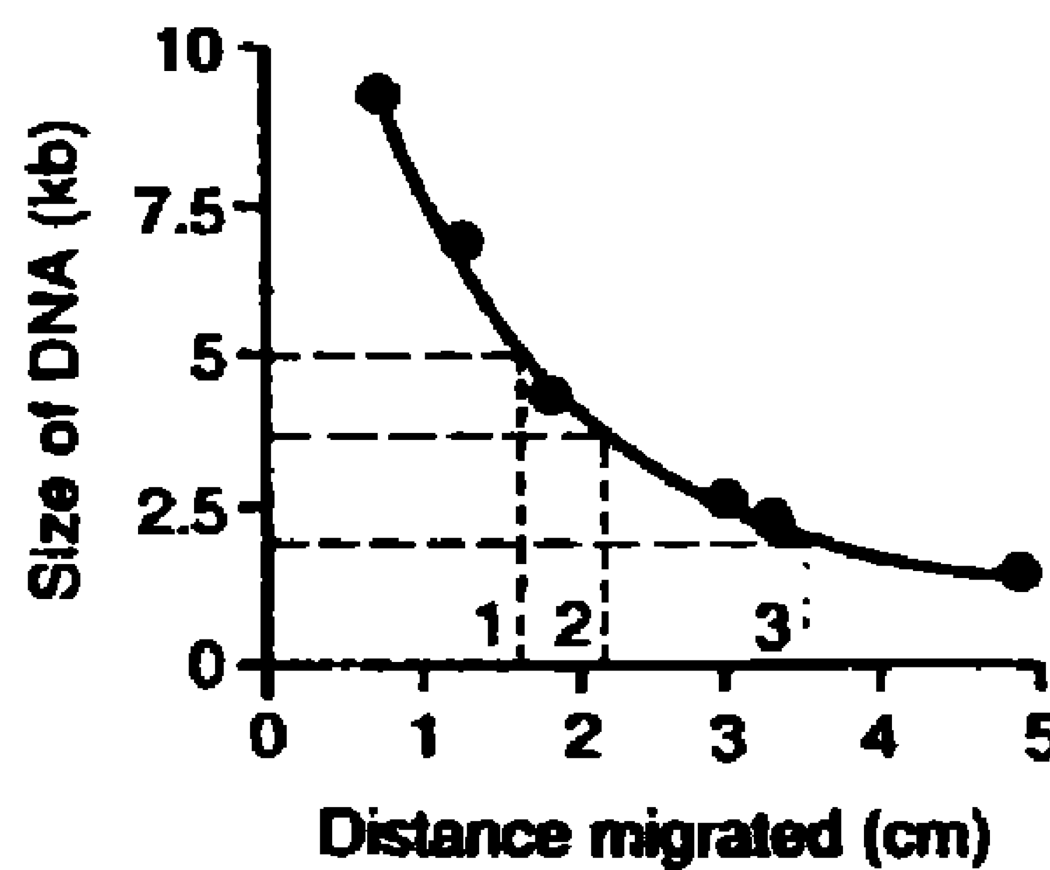
تحديد أماكن القطع المختلفة على جزيىء دنا
Mapping the positions of different restriction sites on DNA molecule

من الخطوات السابقة أمكن التعرف على عدد وحجم شظايا دنا المطلوب إختباره. تكون الخطوات التالية لذلك هو عمل تحليل أى تحديد مواقع القطـع (مواقـع قطـع محددة) restriction analysis، ويكون ذلك بعمل خريطة توضح المواقع النسبية على جزيىء دنا لمواقع التعرف المختلفة recognition sequences لعـدد مـن إنزيمـات القطع الداخلية المشروطة المختلفة.

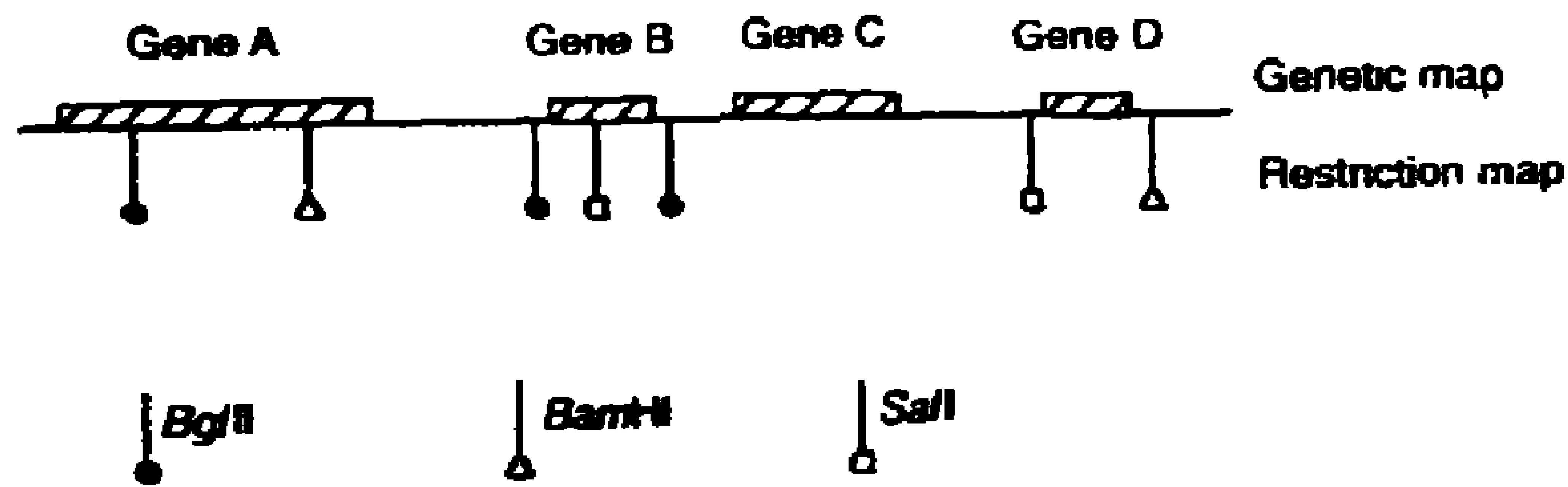
عندما يكون لدينا خريطة قطع restriction map، وهى عبارة عن شكل يوضـح أماكن القطع المختلفة لإنزيمات قطع داخلية مشروطة مختلفة على جزيىء دنا، فإنـه يمكن إختيار الإنزيم المناسب أو الإنزيمات المناسبة لقطع وفصل الجين المطلـوب أو

الجينات المطلوبة كما فى الشكل (شكل ٨٦). يوجـد خريطـة وراثيـة gentic map توضح مواقع الجينات كما يوجد خريطة قطع توضح أماكن قطع أى أماكن عمل لثلاثة إنزيمات قطع داخلية مشروطة أى محددة وهى *Bgl* II و *Sat* I وعند مقارنة خريطة القطع مع الخريطة الوراثية يمكن التعرف على الإنزيمات التى تستخدم فـى فصـل الجين B سليم وفصل الجين C سليم. فى حالة الجين B يستخدم الإنزيم *Bgl* II فـى حالة الجين C يستخدم الإنزيمين *Bam* HI، *Sat* I.





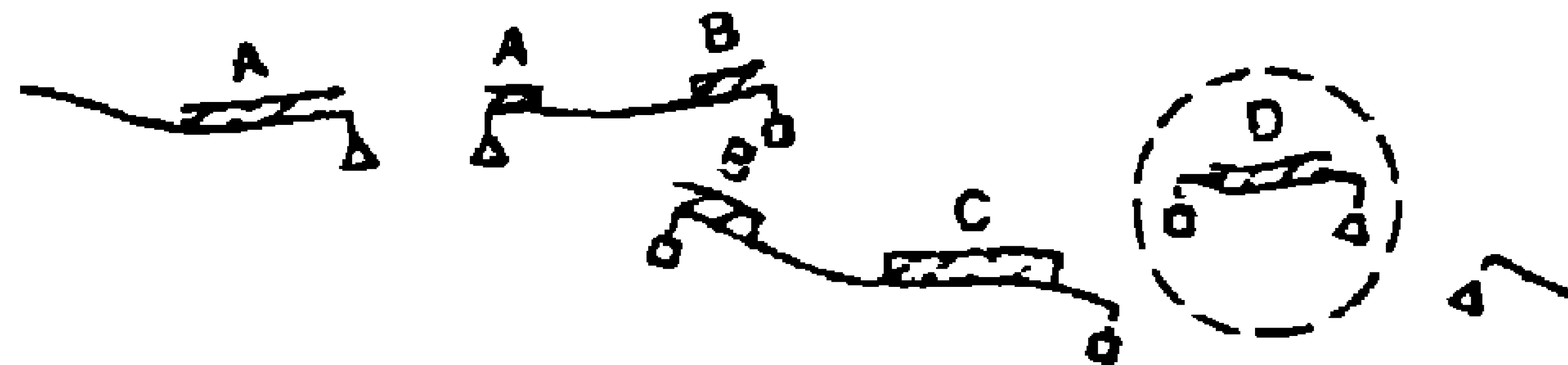
شكل ٨٥: (أ) تقدير حجم شظايا دنا بالعين المجردة، (ب) تقدير حجم شظايا دنا للعينة بواسطة المنحنى القياسى.



To obtain gene B, digest with *Bgl*II



To obtain gene D, digest with *BamHI* + *SalI*



شكل ٨٦: خريطة قطع محدد restriction map وفيها يستخدم إنزيمات قطع داخلى مشروطة أى محددة وذلك للحصول على شظايا دنا تحتوى جين واحد سليم.

لعمل خريطة يجب عمل سلسلة من القطع a series of restriction digest أى سلسلة من الهضم أى القطع. أول شئ فى ذلك هو لابد من تحديد عدد وأحجام الشظايا الناتجة من كل قطع بواسطة كل إنزيم من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة ويكون ذلك بواسطة gel electrophoresis وتسمى هذه بالهضم أو القطع المفرد single dihestion بعد ذلك يتم المقارنة بين هذه الشظايا والمعلمات الحجمية أى الدلالات الحجمية size markers (شكل ٨٧).

هذه المعلومات يجب أن تدعم بسلسلة من الهضم المزدوج (القطع المزدوج) double digestions والمقصود بها أن كل جزيىء من دنا يتم قطعه إلى شظايا بواسطة إنزيمين من إنزيمات القطع الداخلية المشروطة فى آن واحد يمكن عمل ذلك لإنزيمين فى آن واحد لو أن إحتياجات الإنزيمين متماثلة من حيث pH وتركيز

كاتيون المغنيسيوم وغيرها من الإحتياجات اللازمة للتفاعل. بديل عن ذلك أو علاوة على ذلك يمكن عمل التفاعلين للإنزيمين تفاعل تلو التفاعل الآخر وذلك بضبط مخلوط التفاعل بعد التفاعل الأول ليكون مناسب للتفاعل الثانى. مقارنة الهضم الواحد أى القطع الواحد single digest أى بإنزيم واحد بالهضم بإنزيمين أى الهضم المزدوج double digests ستساعد المقارنة على تحديد مواقع القطع للإنزيمات ويمكن منها رسم خريطة لذلك allow restriction sites to be mapped (شكل ٨٧).

قد توجد بعض الحالات المبهمة عند رسم الخريطة فيمكن حلها بعمل هضم جزئى partial digestion أى قطع جزئى.

ويمكن عمل ذلك فى ظروف خاصة مناسبة والتى ينتج عنها قطع فى مواقع قطع محدودة العدد على جزيىء دنا. الهضم الجزئى يتم عمله بواسطة فترة تحضين قصيرة وبذلك لا يتمكن للإنزيم من قطع كل مواقع القطع. يمكن عمل الهضم الجزئى بطريقة أخرى وهى التحضين فى درجة منخفضة حوالى ٤ درجات مئوية وليست ٣٧ درجة مئوية وهى بذلك تحد بدرجة كبيرة من نشاط الإنزيم. نتيجة الهضم الجزئى أن تتكون حزم لها نظام أو توزيع أو شكل معقد complex pattern of bands فى الجل الخاص بـ gel electrophoresis حيث أنه ستتكون أحجام من شظايا دنا غضافية لا توجد فى حالة الهضم الكلى. هذه الأحجام الإضافية من الشظايا تتكون من شظايا مختلفة الأحجام أو منها على سبيل المثال شظيتين أى جزئين من دنا ملتحمين بينهما موقع قطع لم يتم قطعه أى شظيتين ملتحمتين عند موقع قطع لم يتم قطعه.

أحجام هذه الشظايا الإضافية الناتجة من القطع أى الهضم الجزئى توضح ترتيب حدوث الطع فى القطع الكامل complete digestion أى الهضم الكلى (القطع الكلى) وذلك عند مقارنة القطع الجزئى مع القطع الكلى وذلك بمقارنة أحجام الشظايا فى الأول مع أحجام الشظايا فى الثانى (شكل ٨٧).

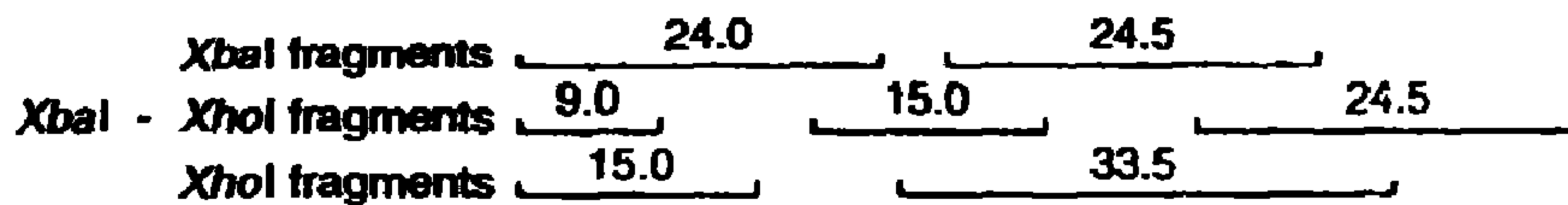
Single and double digestions

Enzyme	*Number of fragments*	*Sizes* (kb)
*Xba*I	2	24.0 24.5
*Xho*I	2	15.0 33.5
*Kpn*I	3	1.5 17.0 30.0
*Xba*I + *Xho*I	3	9.0 15.0 24.5
*Xba*I + *Kpn*I	4	1.5 6.0 17.0 24.0

Conclusions:

1. As λ DNA is linear, the number of restriction sites for each enzyme is *Xba*I 1, *Xho*I 1, *Kpn*I 2.

2. The *Xba*I and *Xho*I sites can be mapped:



The only possibility is: *Xho*I *Xba*I — 15.0 | 9.0 | 24.5

3. All the *Kpn*I sites fall in the 24.5 kb *Xba*I fragment, as the 24.0 kb fragment is intact after *Xba*I - *Kpn*I double digestion. The order of the *Kpn*I fragments can be determined only by partial digestion.

Partial digestion

Enzyme	*Fragment sizes* (kb)
*Kpn*I - limiting conditions	1.5, 17.0, 18.5, 30.0, 31.5, 48.5

Conclusions:

48.5 kb fragment = uncut λ.
1.5, 17.0 and 30.0 kb fragments are products of complete digestion.
18.5 and 31.5 kb fragments are products of partial digestion.

The *Kpn*I map must be: *Kpn*Is — 30.0 | 1.5 | 17.0

Therefore the complete map is: *Xho*I *Xba*I *Kpn*Is — 15.0 | 9.0 | 6.0 | 1.5 | 17.0

شكل ٨٧: خريطة قطع Restriction mapping توضح كيف أن الموقع الثلاثة *Xba*I، *Xho*I، *Kpn*I على جزيء دنا الفاج لامدا يمكن تحديدها.

وفيما يلي شرح للشكل (شكل ٨٧).

مطلوب عمل خريطة قطع لثلاثة مواقع وهى *Xba* I، *Xho* I، *Kpn* I على جزيىء دنا الفاج لامدا. سنقوم بعمل هضم مفرد وهضم مزدوج بواسطة الإنزيمـــات *Xba* I، *Xho* I، *Kpn* I وسيكون الناتج تكوين عدد من الشظايا ذات أحجام مختلفة كمـــا فـــى الجدول.

جدول ٧: إنزيمات القطع الداخلى المشروطة ونشاطها.

الإنزيم	عدد الشظايا	أحجام الشظايا (كيلو قاعدة kb)
Xba I	٢	٢٤، ٥، ٢٤
Xho I	٢	١٥، ٥، ٣٣
Xpn I	٣	١,٥، ١٧، ٣٠
Xbia I + *Xho* I	٣	٩، ١٥، ٥، ٢٤
IXba I + *Kpn*	٤	١,٥، ٦، ١٧، ٢٤

من الجدول السابق يتضح ما يلـــى (جدول ٧):

١ – حيث أن جزيىء دنا الفاج لامدا شريطى (خيطى) فإن عدد مواقع القطع لكل إنزيم من الإنزيمات السابقة هى I للإنزيم *IXba* I، للإنزيم *Xho* I، ٢ للإنزيم *Xpn* I.

٢ – مواقع القطع *Xba* I، *Xho* I يمكن تحديدها من تحليل عدد وحجم الشظايا كما فى رقم ٢ فى الشكل وذلك نتيجة الهضم المفرد والهضم المـــزدوج. يكـــون الاحتمال الوحيد للموقعين كما فى رقم ٢ فى الشكل.

٣ – مواقع الإنزيم *Kpn* I، أى مواقع القطع لهذا الإنزيم تقع جميعها فى الشـــظية ٢٤,٥ كيلو قاعدة. حيث أن الشظية ٢٤ كيلو قاعدة تكـــون ســـليمة بعـــد إستخدام الهضم المزدوج بالإنزيمين *Kpn* I، *Kba* I. ترتيب القطع لتكـــوين الشظايا الناتجة عن الإنزيم *Kpn* I يمكن التعرف عليها فقط بعمـــل الهضـــم الجزئى.

بعد عمل الهضم الجزئى بواسطة الإنزيم *Kpn* I فـإن الشـظايا الناتجـة تكـون أحجامها ١,٥، ١٧، ١٨,٥، ٣٠، ٣١,٥، ٤٨,٥ كيلو قاعدة. نتيجة لذلك إنه يوجـد شظية ٤٨,٥ كيلو قاعدة لم تقطع. ناتج القطع الكامل أى القطع الكلـى هـى ثلاثـة أحجام من الشظايا وهى ١,٥، ١٧، ٣٠ كيلو قاعدة، يلاحظ أن هذا قطع مفرد كلـى لهذا الإنزيم. ناتج القطع الجزئى أحجام عديدة وهى ستة أحجام منها أربعة متماثلـة مع القطع المفرد الكلى لهذا الإنزيم ومنها شظيتين ذات حجمين جديدين وهما ١٨,٥، ٣١,٥. ونتيجة لمجموع ما سبق فإن موقع *Kpn* I يكون كما فى الشكل ولا يكون إلا هذا الموقع نتيجة لتحليل أحجام الشظايا بالهضم الكلى والهضم الجزئى.

ولذلك تكون مواقع القطع لهذه الثلاثة إنزيمات على خريطة القطع كما فى الشـكل (شكل ٨٧).

الربط أو الإلتحام أو اللصق لجزيئات دنا
Ligation

وهو عبارة عن لصق أى لحم أى ربط جزيئين دنا منفصلين أحدهما ناقل متحرك vector molecule والآخر الجين أو الجينات المراد لحمها والإنزيم الذى يقوم بهـذه العملية يسمى ليجيز دنا DNA ligase.

طريقة عمل دنا ليجيز The mode of action of DNA ligase:

جميع الخلايا الحية تنتج دنا ليجيز وهى أنواع عديدة من دنا ليجيز (ليجيز دنـا) DNA ligases ولكن الإنزيم المستعمل فى الهندسة الوراثية ينقى عادة من البكتيريا إ. كولاى التى تم إصابتها بالفاج T4. حيث أن هذا الإنزيم يقوم بإصلاح جزيـئ دنـا repairing وهى وظيفة هامة جداً لهذا الإنزيم حيث أنه يقوم بإصلاح عدم إستمرارية جزيئ دنا فى أحد الشريطين أى حلزونى دنا أى يجعلـه مسـتمر. تعـرف عـدم إستمرارية discontinuities جزئ دنا هو أن الرابطة الفوسفورية ثنائيـة الأسـتر

phosphodiester bond بـــين نيوكليوتيـــدتين متجـــاورتين غائبـــة. تختلـــف عـــدم الإستمرارية discontinuities عن القطع nick حيث أنه فى الأخير يوجد نيوكليوتيدة واحدة أو أكثر غائبة. يمكن أن تحدث عدم إستمرارية جزيىء دنا فى الخلية نتيجـــة للصدفة أى كسر بالصدفة chance breakage ولكنها هى أيضاً نتيجة عادية طبيعيـــة فى حالة تضاعف جزيىء دنا وأيضاً فى حالات إعادة صـــياغة جزيـــىء دنـــا DNA replication and recombination. وهكذا فإن إنزيمات ليجيز دنا لها أدوار حيويـــة عديدة وفعالة فى الخلية.

تحدث عملية الإلتحام فى أنبوبة الإختبار بواسطة إنزيمـــات الـــربط أى إنزيمـــات الإلتحام أى إنزيمات اللصق ligases حيث أنها تقوم بأنواع مختلفة من عملية الإلتحام بين جزيئات دنا وهى ما يأتى:

١ – إصلاح عملية عدم إستمرارية جزيىء دنا فى أحد الحلزونين.

٢ – ترتبط أى تلتحم جزيئين دنا مختلفين ومنفصلين.

٣ – ترتبط أى تلحم نهايتين منفصلتين لنفس جزيىء دنا.

آلية حدوث الإلتحام بواسطة هذه الإنزيمات واحدة فى جميع الحالات السابقة حيث أنه عبارة عن لصق أى لحم عن طريق الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر فى حالـــة عدم إستمرارية الجزيىء أما فى حالة لحم جزيئين مختلفـــين مـــن دنـــا أو نهـــايتين منفصلتين من جزيىء دنا فإن يلزم تخليق رابطتين فوسفوريتين ثنائية الإستر وتكون رابطة لكل شريط أو حلزون.

النهايات أى الأطراف اللزجة تزيد من كفاءة الإلتحام

Sticky ends increase the efficiency of ligation

تحدث عملية الإلتحام بقلة جداً فى حالة النهايات المستقيمة حيث أن إنزيم الإلتحام لا يمكن أن يقوم بعملية الإلتحام إلا بعد تقابل الأطراف المستقيمة مع بعضـــها علـــى إستقامة واحدة حيث أنه غير قادر على عمل هذه العملية أى catch hold للنهـــايتين

المستقيمتين ومقابلتهما لبعضهما. ولذلك لابد من انتظار الفرصة والحظ لكى تتقابل الأطراف تماماً وتكون على إستقامة واحدة ثم يقوم الإنزيم بلصقها. عامة يمكن زيادة النسبة أو الدرجة بزيادة التركيز.

ولكن فى حالة الأطراف اللزجة تكون الحالة أسهل وتعداد تكرارية حدوثها كبير جداً حيث أن الأطراف اللزجة المتوافقة تلتصق ببضعها بواسطة روابط إيدروجينية مكونة تراكيب ثابتة ونتيجة لذلك يعمل إنزيم ليجيز دنا بسهولة لتكوين الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر ويحدث الإلتحام بسهولة وبدرجة كبيرة وتكرارية عالية. إذا لم تتكون الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر بسرعة فإن الأطراف اللزجة ستتباعد مرة أخرى وتنفصل.

تخليق أطراف لزجة على الأطراف المستقيمة:

Putting sticky ends on to a blunt-ended molecule

بإستخدام إنزيم (أو خليط من إنزيمات) النيوكلييز الداخلى المشروط إنزيم القطع الداخلى المشروط لدنا فإنه يمكن الحصول على أطراف لزجة ناتجة من الهضم بواسطة الإنزيم أو الإنزيمات لكل من دنا الناقل المتحرك ودنا المطلوب توطينه. ولكن لا يحدث ذلك دائماً بل نتيجة لما سبق يحدث عادة تكوين أطراف لزجة للناقل المتحرك vector ولكن شظايا دنا المطلوب توظينها تكون ذات أطراف مستقيمة. ولذلك لابد من تحوير الطرف المستقيم لهذه الشظايا لمى يصبح طرف لزج ويكون ذلك بإحدى ثلاثة طرق وهى ما يأتى:

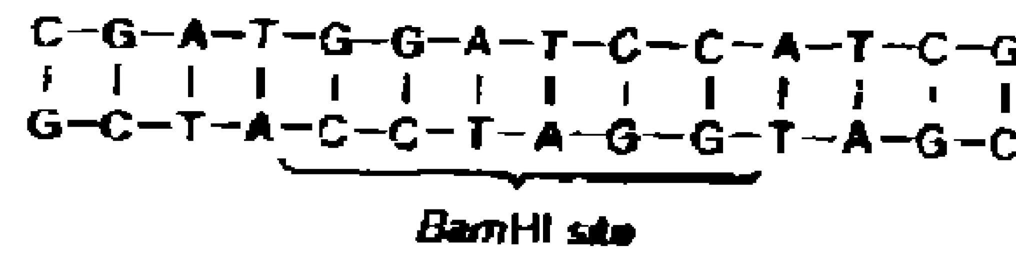
١ – الوصلات linkers: هى عبارة عن قطع صغيرة من دنا ثنائى الحلزون لها تتابع نيوكليوتيدات معروف تماماً، يتم تخليق هذه الوصلات فى أنابيب الإختبار مثال لذلك الوصلة *Bam* HI (شكل ١٨٨) حيث أن الوصلة لها أطراف مستقيمة ولها موقع قطع restriction site هو *Bam* HI فى هذا المثال.

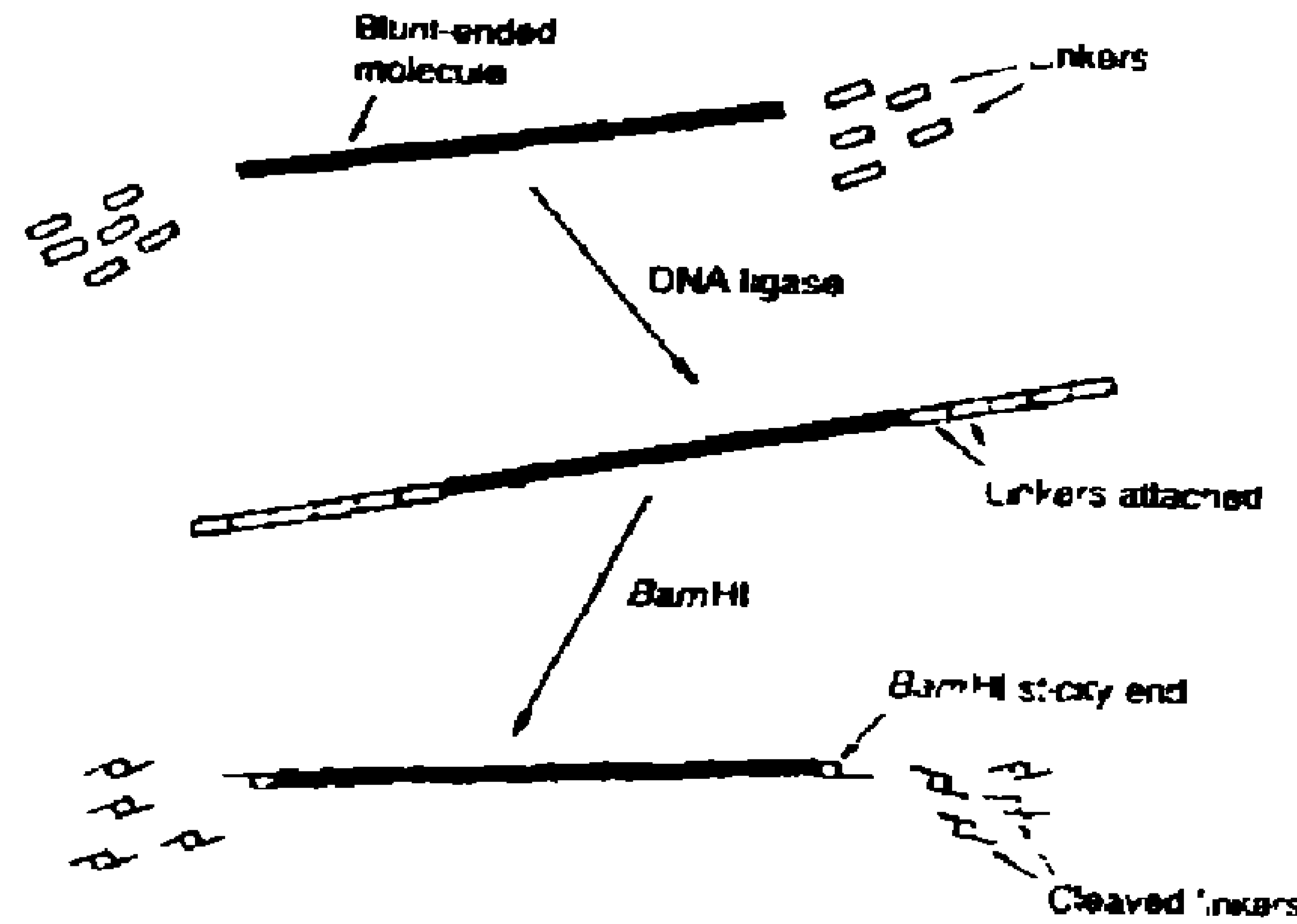
يقوم إنزيم ليجيز دنا بلصق الوصلة بأطراف لجزيئات دنا كبيرة الحجم ذات

أطراف مستقيمة. بالرغم من حدوث الإلتحام بين أطـراف مسـتقيمة blunt-ended ligation حيث أن الوصلات لها أطراف مستقيمة فإن الإلتحام يحدث بسهولة وبكثرة، حيث أن هذه الوصلات يمكن تخليقها بسهولة فى المعمـل وبكثـرة، تضـاف هـذه الوصلات بكثرة وبتركيز مرتفع جداً فى مخلوط التفاعل وذلك يحدث الإلتحام بكثـرة. يمكن أن يلتحم مع جزيىء دنا أكثر من وصلة واحدة واحدة تلو الأخرى وهذه تكون مرتبة على هيئة سلسلة من الوحدات (شكل ٨٨). عند إستخدام إنزيم القطـع *Bam* HI يسبب إنشقاق الوصلات فى مكان القطع المخصص لها لينتج عنها أطراف لزجة. ينتج عن ذلك عديد من الوصلات اللزجة كما أن جزيىء دنا يصبح ملتصق بطرفيـه وصلتين لزجتين (شكل ٨٨)، تكون النتيجة هى تكوين أعداد كبيرة من وصلات لزجة علاوة على ذلك جزيىء دنا يكون على طرفيه وصلات لزجة.

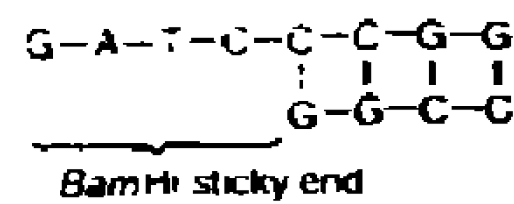
هذه الشظية المحـورة من دنا ذات الطرفيـن اللزجين تكـون قابلـة للإلتحـام بسهولة جداً مع جزيىء دنا الناقل الوسيط والذى يكون تم قطعـه أيضـاً بواسـطة الإنزيم *Bam* HI.

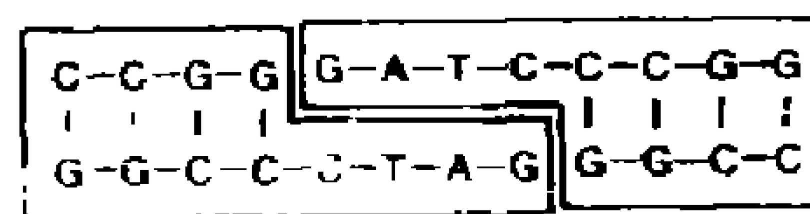
٢ – المأقلمات adaptors: من عيوب الوصلات أنه يمكن لإنزيم القطع أن يقطع أيضاً جزء من الجزيىء المطلوب، حيث يحتوى هذا الجزيىء من دنا على نفس تتابع الوصلات فيقطع مثلاً إنزيم *Bam* HI الوصلات وأيضاً جزيـىء دنـا فـى الأمـاكن المخصصة له وبذلك يمكن أن يكون الجين المطلوب فى دنا قد تجزأ وبـذلك يفسـد الجين ولا يصلح وتفسد التجربة. ولذلك تفضل المأقلمات عن الوصلات لأنها تتلافـى هذا العيب. المأقلمات مثل الوصلات تتكون من جزيىء قصير قيـل النيوكليوتيـدات ولكن يتم تخليقها بحيث يكون لها أطراف لزجة (شكل ٨٩). المأقلم له طرف مستقيم وطرف لزج وفى هذه الحالة يلتحم الطرف المستقيم من المأقلم مع الطرف المستقيم لجزيىء دنا ويحدث ذلك فى كلا الطرفين لجزيىء دنـا، تكـون النتيجـة أن يصـبح جزيىء دنا له طرفين لزجين ناتجين عن مأقلمين.

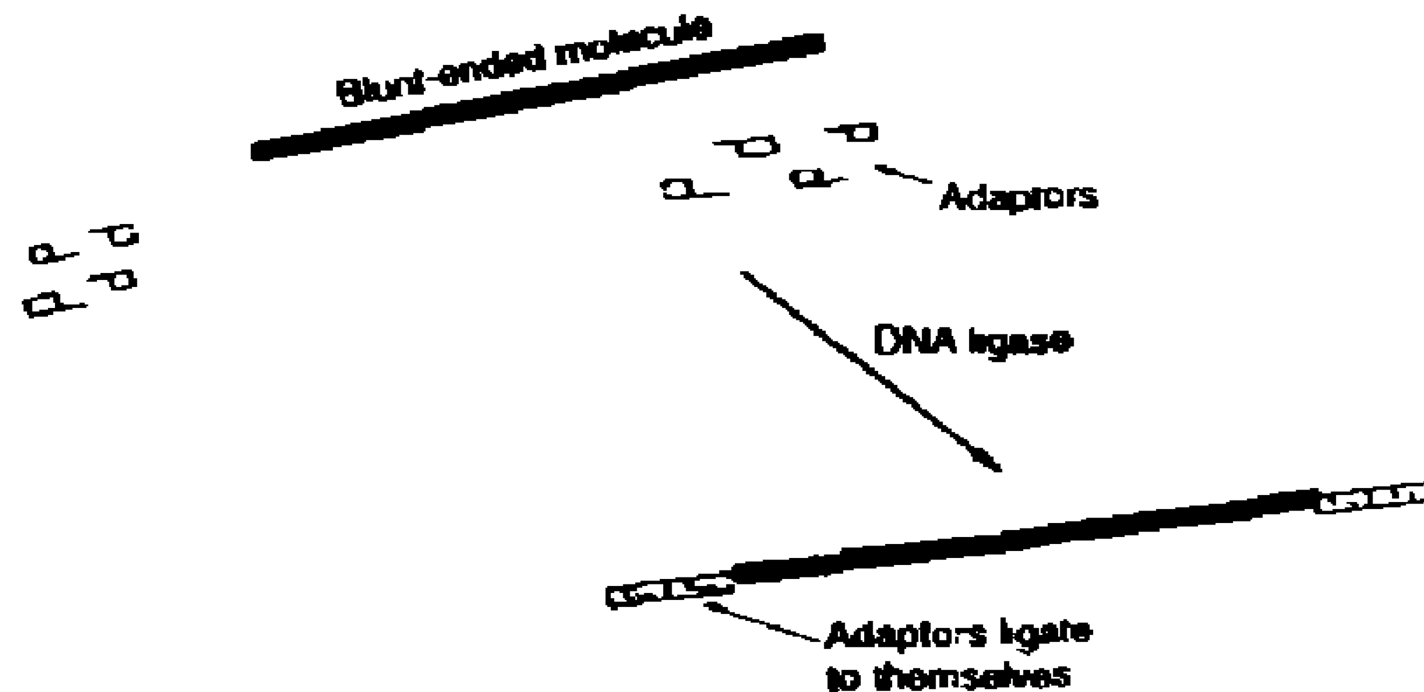




شكل ٨٨: الوصلات وإستعمالها، (أ) تركيب مثالي لوصلة، (ب) إلتحام الوصلات بالأطراف المستقيمة لجزيء دنا







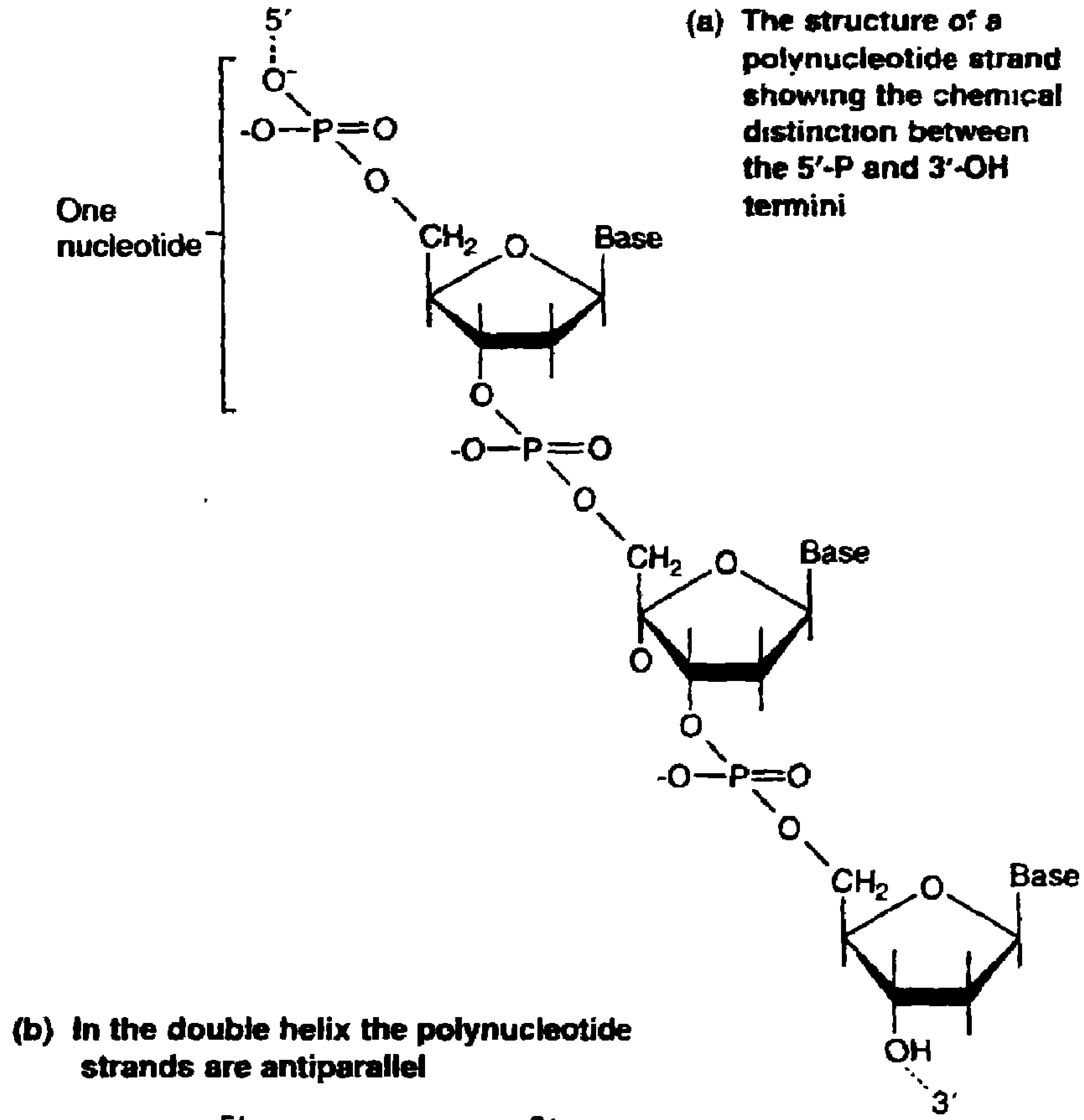
شكل ٨٩: المأقلمات، (a) مأقلم مثالي، (b) إثنين من المأقلمات يمكن أن يتحدا يكون جزيء مشابه للوصلة، (c) بعد إلتحام المأقلمات يظل الطرف المستقيم كما هو مستقيم ونحتاج إلى إنزيم قطع داخلي مشروط أى محدد لعمل أطراف لزجة.

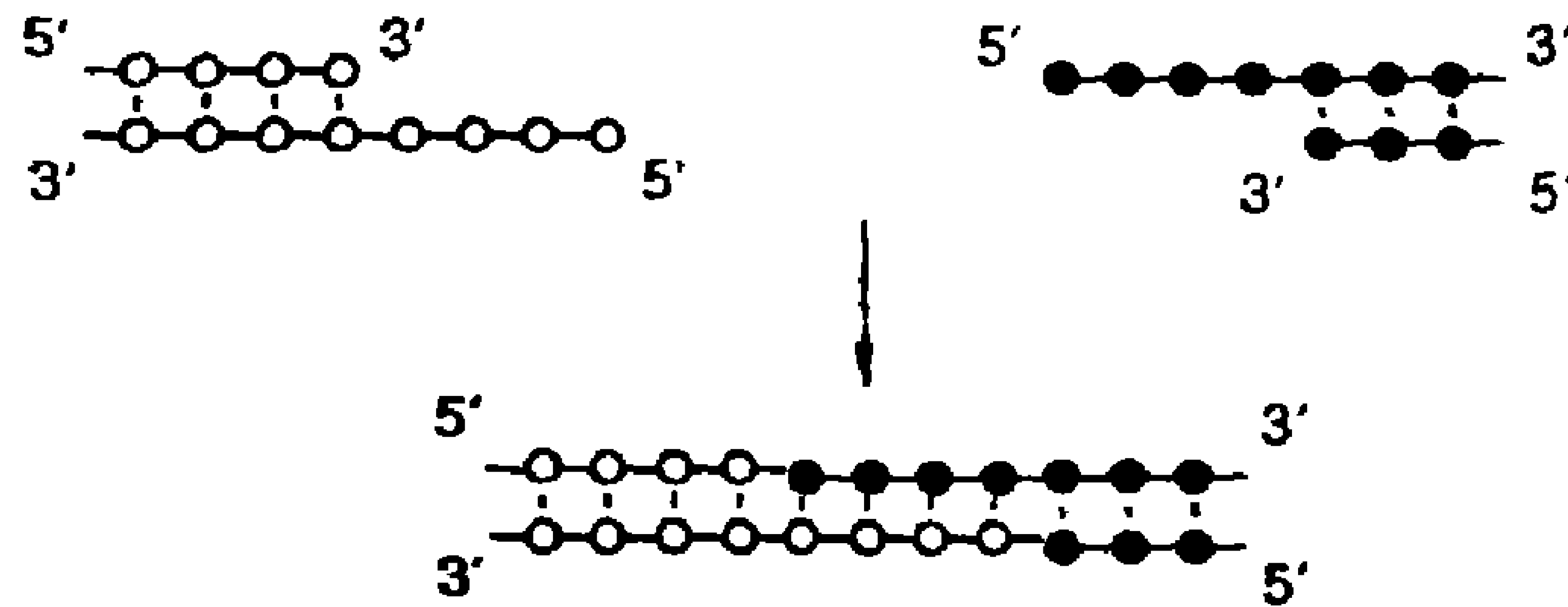
ولكن من عيوب هذه الطريقة أن المأقلمات تلتحم بسهولة جداً من أطرافها اللزجة وبذلك يصبح طرف جزيىء دنا عبارة عن طرف مستقيم لأنه يتكون من إلتحام زوج من المأقلمات dimmers ولذلك نحتاج مرة أخرى إلى إنزيمات قطع كما فى حالة الوصلات وهكذا يصبح للمأقلمات نفس عيوب الوصلات.

والإجابة على ذلك تكمن فى معرفة التركيب الكيماوى الدقيق لأطراف جزيىء المأقلمات. طرفى جزيىء أى شريط عديد النيوكليوتيدات مختلفيين طبيعياً، وهذه حقيقة معروفة (شكل ٩٠). حيث أن أحد الطرفين يسمى الطرف ´5 أى 5´-terminus وهو يحمل مجموعة فوسفات 5´P والطرف الآخر ´3 أى 3´-terminus ذو مجموعة إيدروكسيد 3´-OH. وفى حالة الحلزونين الملتفيم على بعضهما يكونان متقابلين متوافقين ولكنهما يكونان مختلفان فى ترتيب القواعد antiparallel ولذلك فإن كل طرف يتكون من نهاية مجموعة فوسفات ´5 أى 5´-P ونهاية أخرى فى نفس الطرف تكون مجموعة OH أى 3´-OH (شكل ٩٠).

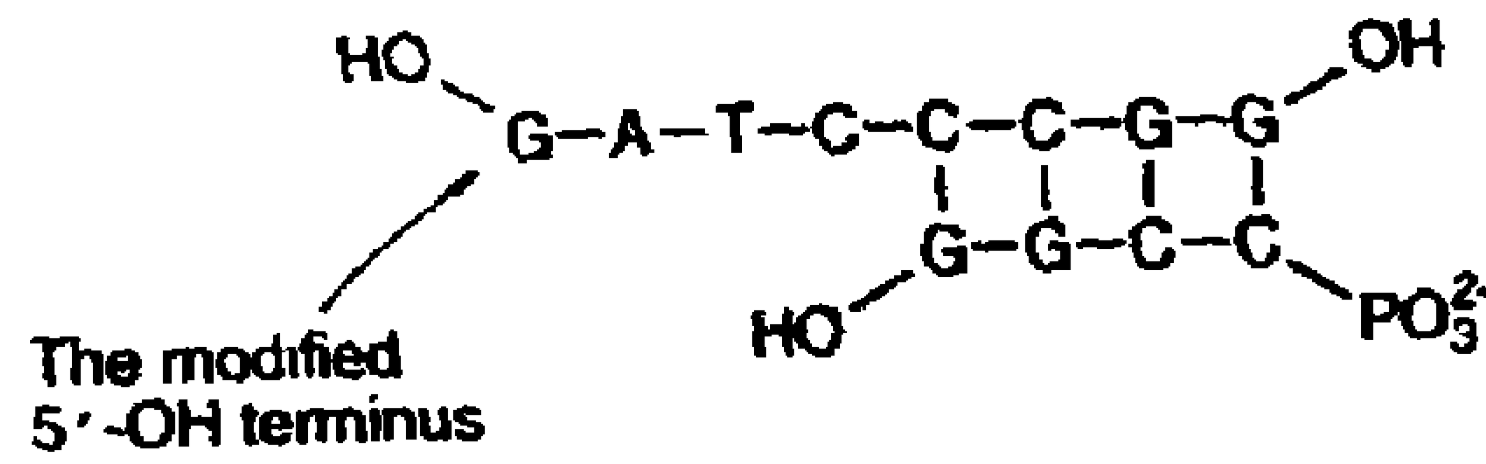
المأقلمات يتم تصنيعها أى تخليقها بحيث أن الطرف المستقيم يكون مماثل تماماً للدنا الطبيعى ولكن الطرف اللزج يكون مختلف. النهاية 3´-OH للطرف اللزج تكون كما هى كالمعتاد ولكن الطرف 5´-P يكون محور حيث أنه ينقصه مجموعة فوسفات وهو فى الحقيقة عبارة عن نهاية 5´-P (شكل ٩٢). إنزيم ليجيز دنا يكون غير قادر على تكوين رابطة فوسفورية ثنائية الإستر بين النهاية 5´-OH. ولذلك فإن إلتحام المأقلمات مع بعضها لن يحدث. وهكذا يمكن إلتحام المأقلمات مع جزيىء دنا ولكن لا يحدث الإلتحام مطلقاً فيما بينها.

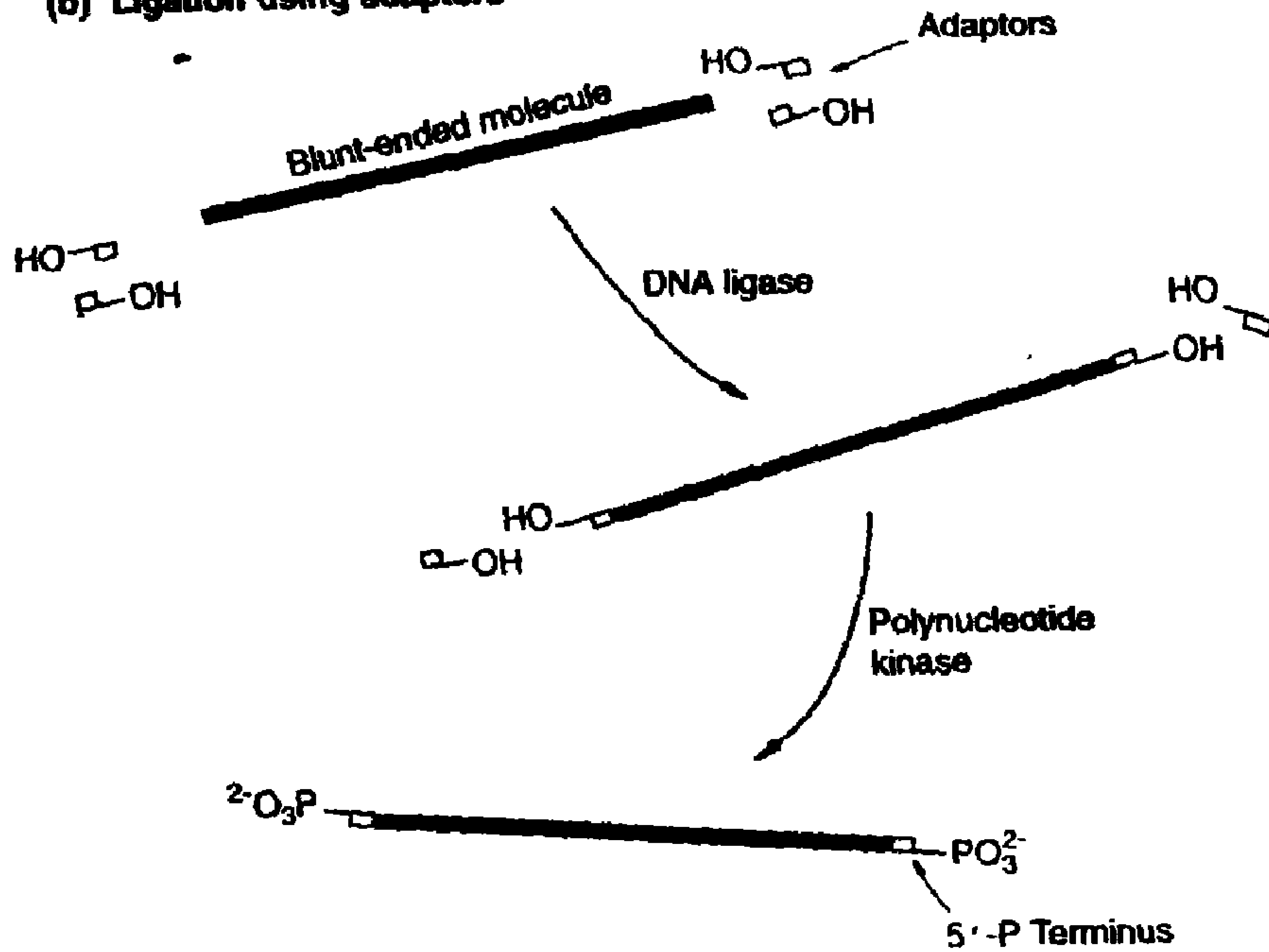
بعد تمام إلتحام المأقلمات مع جزيئات دنا فإن الأطراف الغير طبيعية ذات النهاية 5´-OH يتم تحويلها إلى نهايات عادية نهاية 5´-P ويكون ذلك بواسطة إنزيم polynucleotide kinase وهكذا تنتج أطراف لزجة أى يصبح جزيىء دنا عبارة عن شظية ذات طرفين لزجين وهكذا يمكن إدخال هذه الشظية بسهولة فى الناقل الوسيط المتحرك vector.





شكل ٩٠: التمييز بين الطرف 5´-P والطرف 3´-OH لجزيء عديد النيوكليوتيدات، (أ) تركيب عديد النيوكليوتيدات يوضح النهاية 5´-P والنهاية 3´-OH، (ب) حلزون دنا antiparallel، (جـ) الإلتحام بين الطرف 5'-P والطرف 3´-OH.





شكل ٩١: إستخدام المأقلمات، (أ) تركيب جزيء لمأقلم، (ب) تحويل الأطراف المستقيمة إلى أطراف لزجة بإستخدام المأقلمات.

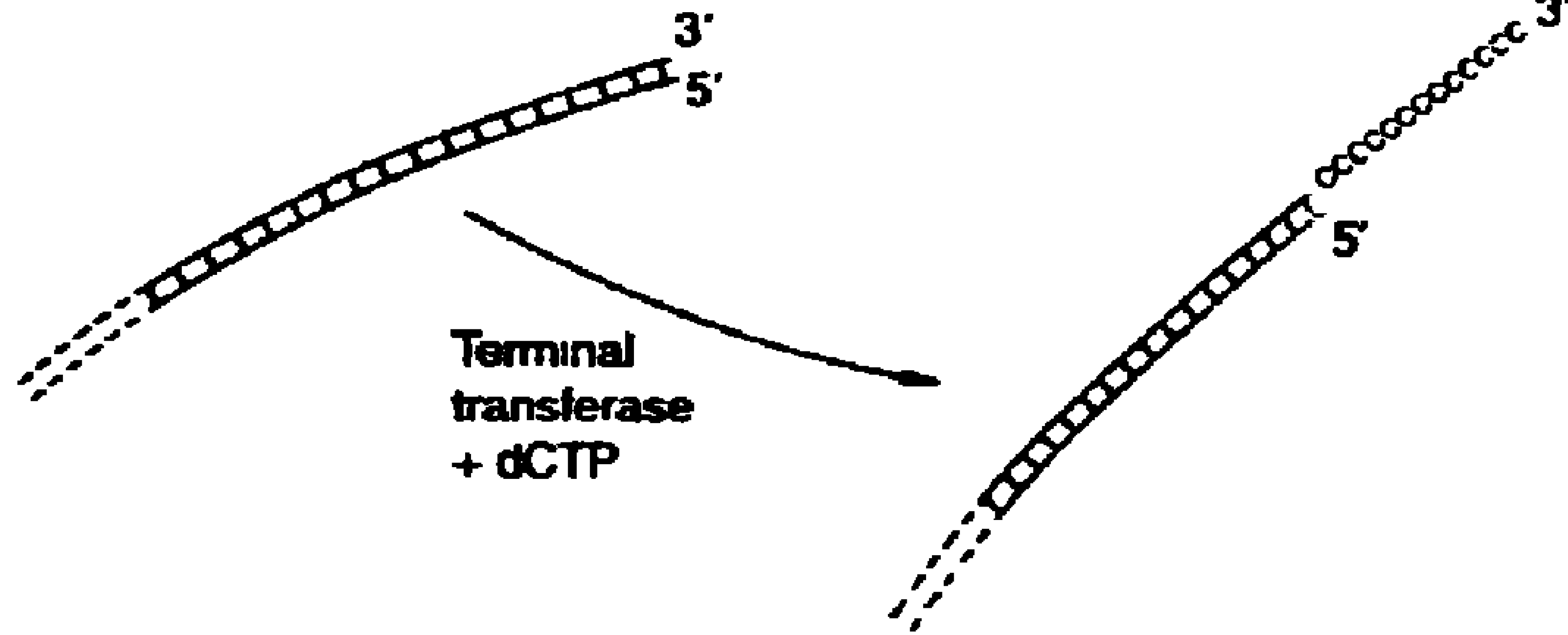
٣ – تكوين الأطراف اللزجة بوسطة ذيل عديد البلمرات المتجانسة :Producing sticky ends by homopolymer tailing

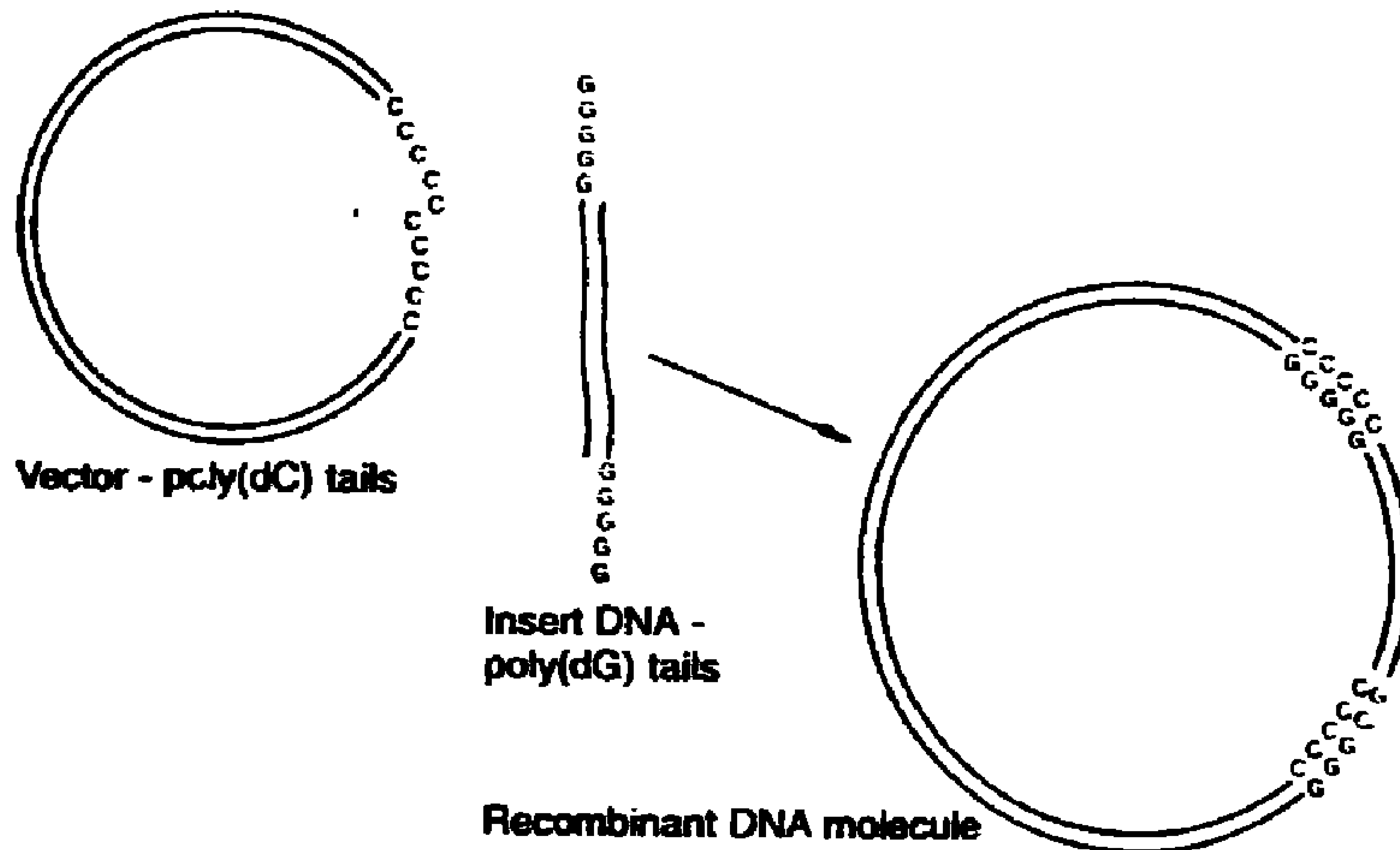
تسمى تكوين الأطراف اللزجة بواسطة ذيل عديد البلمرات المتجانسة بإسم طريقة الذيل عديد البلمرات المتجانسة the technique of homopolymer tailing. عديد البلمرات المتجانسة homopolymer عبارة عن عديد البلمرات الذى تكون جميع وحداته متجانسة بإفتراض أن شريط دنا يتكون كلية من قاعدة واحدة مثلاً deoxyguanosine يكون مثال لجزيىء عديد البلمرات المتجانسة ويسمى فى هذه الحالة بإسم polydeoxyguanosine أى poly (dG).

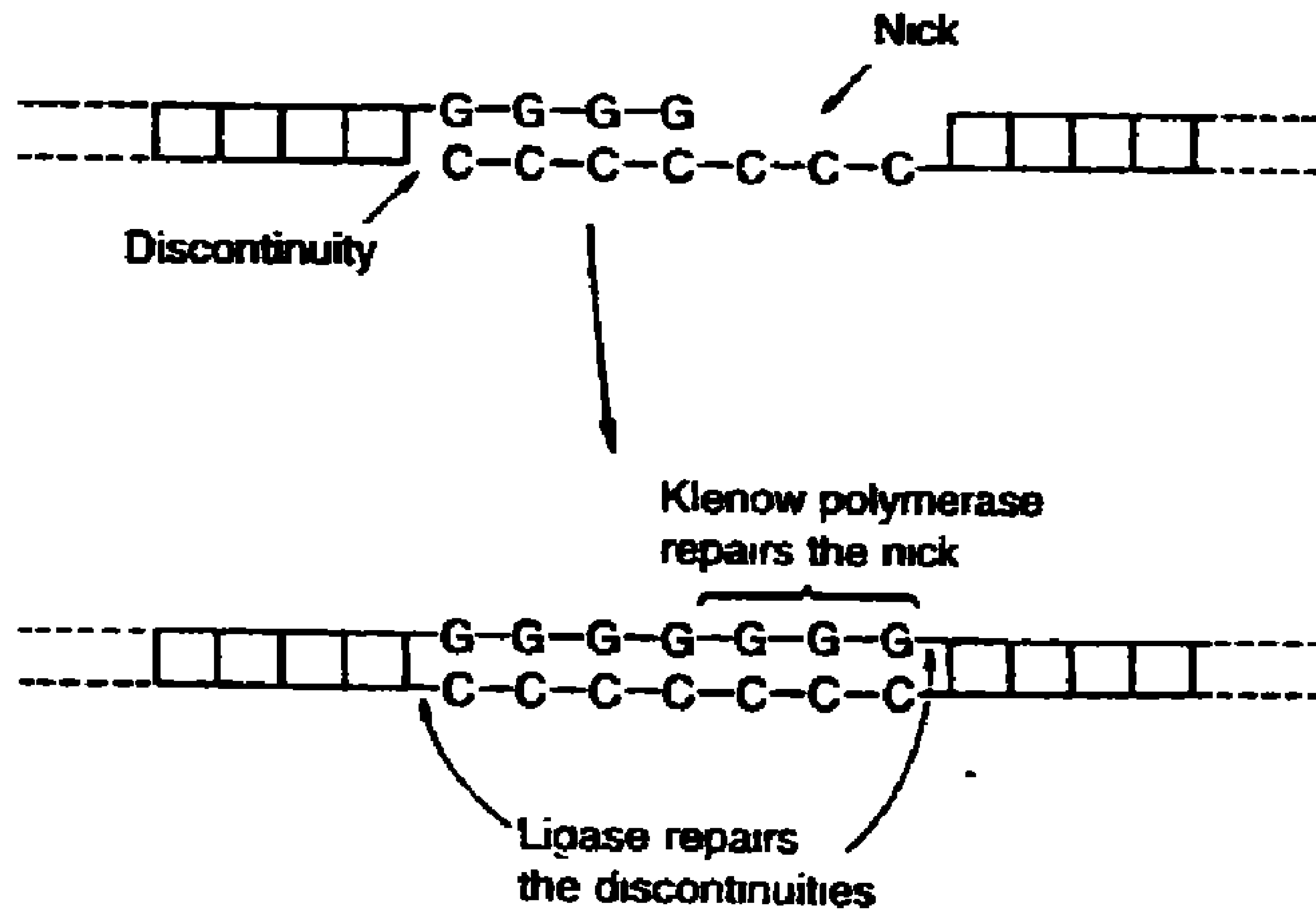
تكوين الذيل يحتاج إلى إستخدام إنـزيم طرفـي deoxynucleotidyl transferase ليضيف سلسلة من نيوكليوتيد واحد على الطرف 3'-OH لجزيىء دنا ثنائى الحلزون. يلاحظ أنه سيضيف السلسلة على طرفى جزيىء ثنائى الحلزون لأن كل طـرف لـه نهايتين أحدهما 5'-P والنهاية الأخرى 3'-OH. وهكذا غذا عمل هذا التفاعل السـابق فى وجود الإنزيم السابق فى وجود نوع واحد من النيوكليوتيدات فإنه سيتكون الذيل (شكل ٩٢). ليمكن إلتحام جزيئين دنا مختلفين ولكل منهما نهايتين ذات ذيل، يجب أن تكون الذيول متوافقة ومثال ذلك شظية لها ذيل جوانين poly (dG) وجزىء دنا آخر عبارة عن ناقل وسيط له ذيل عبارة عن سيتوسين poly (dC) وهكذا فإن ذيل الشظية جوانين سيتزاوج مع ذيل الناقل الوسيط سيتوسين. وهكذا فإن إزدواج وتزاوج القواعد سيحدث بين جوانين وسيتوسين الذيول بين الشظية والناقل المتحرك (شكل ٩٢).

فى الطبيعة ذيل عديد الجوانين عادة لا يكون فى طول ذيل عديد السيتوسين وعند حدوث التزاوج أى الإرتباط بين القواعد فإن الجزيئات المرتبطة سيوجد بها فجـوات nick وعدم إستمرارية discontinuities فى جزيىء دنا (شكل ٩٢). يحدث بعد ذلـك إصلاح لملأ هذه الفجوات وإصلاح عدم الإستمرارية، ولذلك يكـون الإصـلاح فـى خطوتين وهى إستخدام إنزيم بلمرة كلينـاو Klenow polymerase لمـلأ الفجـوات nicks ثم إستخدام إنزيم ليجيز دنا DNA ligase لتخليق الروابط الفوسفورية ثنائيـة الإستر النهائية the final phosphodiester bonds. هذا الإصلاح لا يحدث دائماً فـى أنابيب الإختبار بل يمكن أن يحدث فى خليـة العائل أيضاً فى حالـة زيـادة طـول الذيلين المتوافقين عن عشرون نيوكليوتيدة. فى هذه الحالة سيحدث توافق وتـزاوج بين الذيلين ويكون هذا التوافق والتزاوج ثابـت stable. وهكـذا يحـدث التوافـق والتزاوج الثابت بين الذيلين المتوافقين بين الشظية والناقل المتحـرك الوسيط ليكون a recombinant DNA مع عدم حدوث إلتحام كامل not compketely ligated ويكون من الثبات الكافى ليمكن إدخاله بعد ذلك فى خلية العائل فى الخطوة التالية. عند دخول هذا a recombinant DNA فى خلية العائل فإن إنزيمات العائل وهـى بلمـره دنـا وليجيز دنا تقوم بإصلاح هذا الـ recombinant DNA ويصبح ملتحم تماماً ومتزاوج

تماماً وهكذا فإن إنزيمات العائل تكمل هذه الخطوات التى بدأت فى أنبوبة الإختبار من حيث الإلتحام والتزاوج.







شكل ٩٢: الذيول عديدة البلمرات المتجانسة **Homopolymer tailing**، (أ) تخليق ذيل عديد البلمرات المتجانسة، (ب) تركيب جزيء **recombinant DNA** من شظية دنا ذات ذيل وناقل متحرك ذو ذيل **vector tailed** (مذيل)، (جـ) إصلاح جزيء **recombinant DNA** بإنزيم البلمرة كليناو وإنزيم ليجيز دنا.

الباب السابع

كيفية إختراق إو إدخال دنا الخلايا الحية

كيفية إختراق إو إدخال دنا الخلايا الحية

Introduction of DNA Into Living Cells

بعد تكوين دنا المعاد صياغته كما سبق شرحه فإنه لابد من إدخاله إلى داخل خلية حية وعادة تكوين البكتيريا وقد تكون كائنات حية أخرى. يتم الإحتياج لهذه الخطـوة لكى يصبح دنا المعاد صياغته recombinant DNA متوطن داخل الخلية ثـم تنقسـم هذه الخلايا بسرعة وبالتالى نحصل على وحدات كثيرة من الخلية الحية.وقـد تكـون بأعداد فلكية وبالتالى نحصل على أعداد فلكية من دنا المعاد صياغته بسهولة ويسـر وفى فترة زمنية وجيزة وبدون مجهود كبير. ومثال ذلك أنه عند البدية نبدأ بكميـات قليلة من دنا المعاد صياغته ولتكن قليل من النانوجرامات حيث أن الخلية البكتيريـة الواحدة تأخذ عادة جزيىء دنا واحد معاد صياغته وبعد ذلك تتكاثر البكتيريا ويمكـن أن نأخذ من المستعمرة الواحدة عدة ميكروجرامات من دنا المعاد صـياغته. إذا تـم تنمية البكتيريا على بيئة سائلة فيمكن أن نحصل على عدة ملليجرامات من هذا الـدنا المعاد صياغته وبذلك تتضاعف كميته بهذه الطريقة ملايين المـرات mikkion fold increase in yield وذلك فى فترة وجيزة لا تتعدى أربعة أيام على الأكثر. نحتاج هذه الكميات الكبيرة من دنا أثناء الدراسات على تركيب الجين وأيضاً التعبير عن وظيفته gene structure and expression. وما سبق شرحه ميزة لهذه الطريقة.

أما الميزة الثانية لإدخال دنا المعاد صياغته داخل الخلايا الحية مثل البكتيريا أنها تعتبر طريقة من طرق تنقية دنا المعاد صياغته. حيث إنه بإتباع أحدث وأدق طـرق التنقية فإن دنا المعاد صياغته يكون ملوث بالشوائب بدرجة معينة وتقل هذه الدرجة بإستخدام الطريقة الفائقة الحساسية للتنقية. ونادراً ما يمكن بهذه الطرق الوصول إلى دنا معاد صياغته نقى تماماً غير مختلط مع شوائب. حيث أن المخلوط النـاتج مـن تجارب إعادة الصياغة يحتوى بالإضافة على الجزيىء المعـاد صـياغته المطلـوب جزيئات أخرى وهى كما يلى (شكل ٩٣):

١ – حامل أى ناقل وسيط غير ملـتحم بشـظية مـن دنـا unligated vector molecule.

٢ – شظايا سائبة غير ملتحمة من دنا unligated DNA fragments.

٣ – جزيئات ناقل وسيط أصبحت مغلقة على نفسها على هيئة حلقة بدون إضافة دنا جديد.

Vector molecules that have recircularized without new DNA being inserted (self-ligated vector)

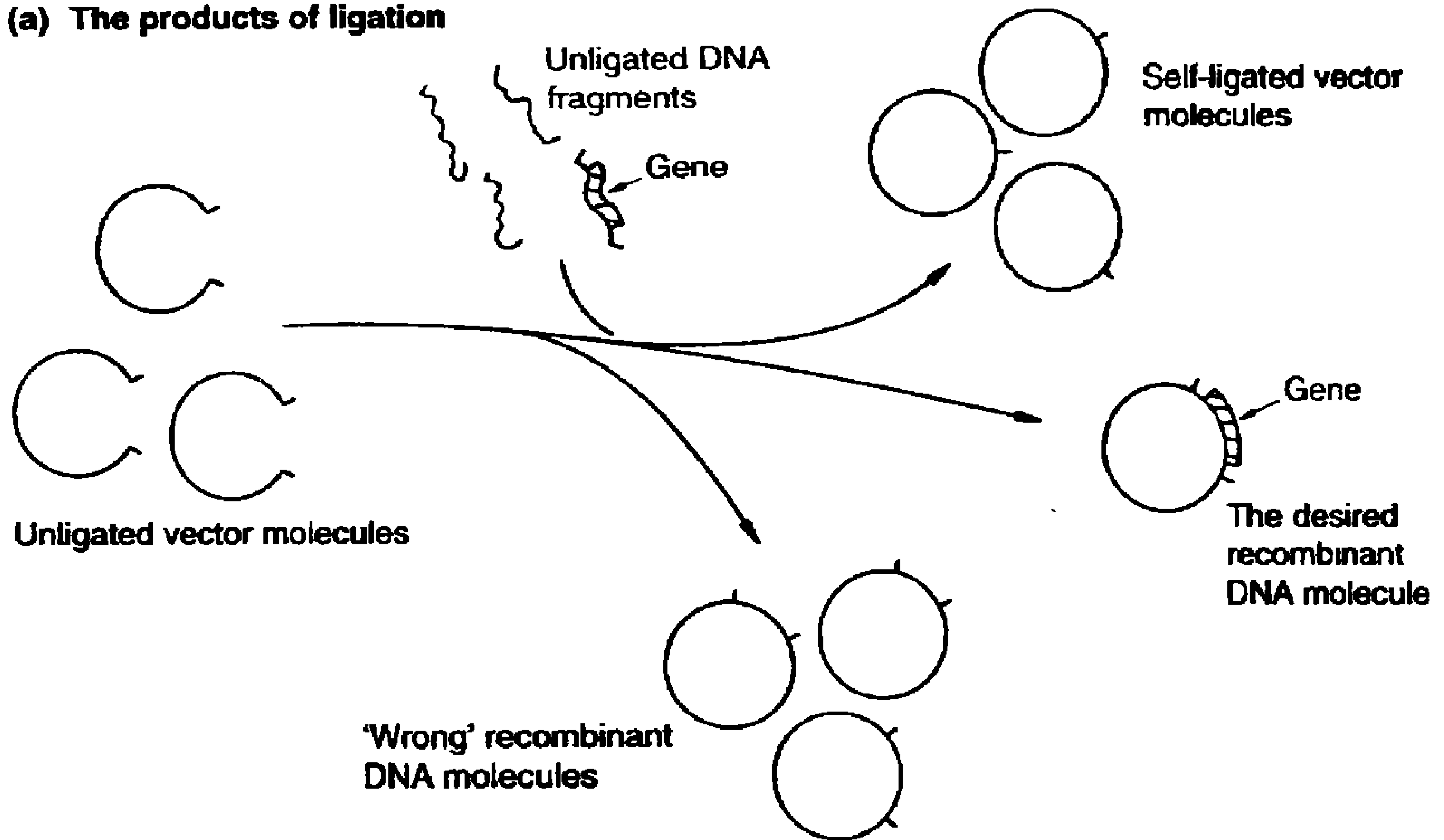
٤ – جزيىء دنا معاد صياغته يحمل شظية من دنا غير مرغوبة.

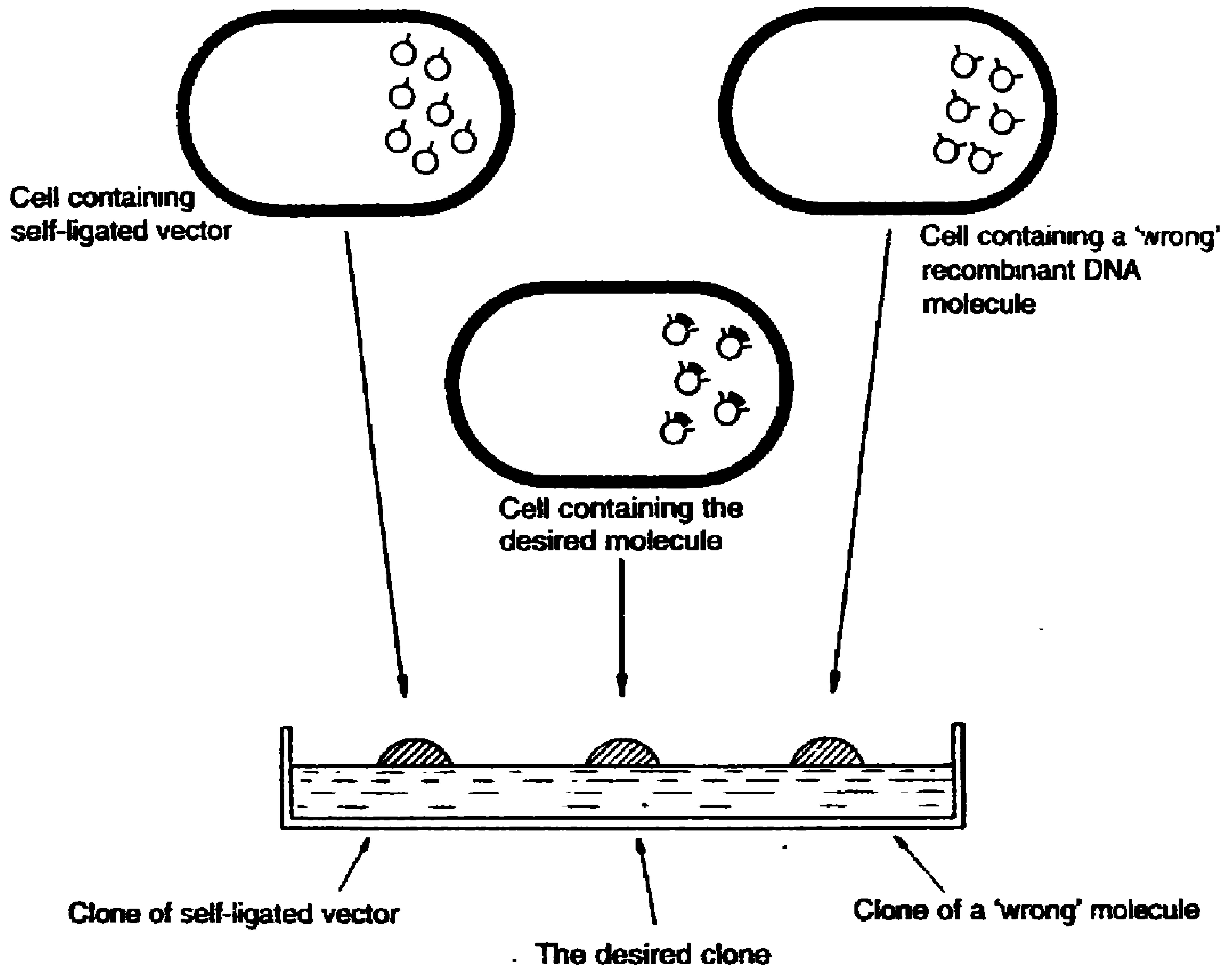
Recombinant DNA molecules that carry the wrong inserted DNA fragment.

فى هذا الباب سيتم شرح كيف أن البلازميد والفاج وجزيئات دنا المعاد صـياغتها المشتقة منهما سيتم إدخالها إلى خلايا البكتيريا. كما سيتم شـرح الطـرق الأخـرى المستخدمة فى كيفية إدخال دنا المطلوب أو شظايا دنا المطلوبة إلـى داخـل خلايـا النبات أو الحيوان. عامة أثناء الشرح فى هذا الباب فإن يكون من الواضح أن إنتخاب المستعمرات البكتيرية المحتوية على جزيئات دنا معاد صياغتها مـن المسـتعمرات المحتوية self ligatd vector يكون سهل.

ولكن الأكثر صعوبة من ذلك كيف تميز بين مستعمرات تحتوى على جزىء دنـا المعاد صياغته المطلوب ومستعمرات تحتوى جزيىء دنا معاد صياغته وغير مطلوب وسيتم شرح ذلك فى باب تال وهو كيف الحصول على clone يحتوى جين معين.

يعتبر التحول (بواسطة البكتيريا) transformation أى أخذ خلية البكتيريا لشظية من دنا من الطرق الهامة لدخول دنا داخـل الخليـة البكتيرية. كما توجـد طريقـة أخرى لذلك وهو نقل جزء من دنا خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أخـرى بواسـطة الفاج وهذا ما يسمى بإسم transduction وفيما يلى شرح مبسط للطرق المـذكورة سابقاً.





شكل ٩٣: المخلوط الناتج من تجارب إعادة الصياغة لدنا.

التحول البكتيرى (أخذ شظية دنا بواسطة خلية البكتيريا)

Transformation – The Uptake of DNA by Bacterial Cells

أغلب أنواع البكتيريا تكون قادرة على أخذ شظايا دنا من البيئة التى تنمو عليها. عادة جزيىء دنا الذى يتم أخذه بهذه الطريقة يتم تحليله ولكن أحياناً يمكن لهذا الجزيىء أن يعيش ويتضاعف فى خلية البكتيريا. يحدث ذلك على وجه الخصوص لو أن جزيىء دنا هو بلازميد وله أصل أو منطقة للتضاعف origin of replication يتم التعرف عليها بواسطة العائل أى خلية البكتيريا.

أخذ دنا وإستقراره وبقاؤه وخاصة إذا كان بلازميد uptake and stable retention a plasmid يمكن التعرف عليه بواسطة الجينات المحمولة على البلازميد والتى يمكن أن تعبر عن نفسها. مثال لذلك حالة البكتيريا إ. كولاى تكون حساسة طبيعياً للتأثيرا المثبط للنمو المضادات الحيوية مثل الإمبسيللين والتتراسيكلين. خلايا البكتيريا التى تحتوى البلازميد pBA322 (هذا البلازميد هو أحد البلازميدات الأولى التى إستخدمت كناقل وسيط للتوطين cloning vector فى السبعينيات) تكون مقاومة للمضادين الحيويين السابقين. وذلك لأن هذا البلازميد يحمل مجموعتين من الجينات أحد هذين المجموعتين به جين خاص بتخليق إنزيم بيتا لاكتاميز B-lactamase والذى يحور من تركيب الأمبيسيللين إلى مركب غير سام لخلية البكتيريا والمجموعة الثانية من الجينات والتى تكون مسئولة عن تخليق إنزيمات تعادل من سمية التتراسيكلين. وهكذا فإن أخذ خلايا البكتيريا لهذا البلازميد حول transformed هذه الخلايا من البكتيريا إ. كولاى من خلايا حساسة للأمبسيللين والتتراسيكلين amp^s tet^s إلى خلايا مقاومة لهما amp^R tet^R.

وفى هذه الأيام أصبح الإصطلاح transformation عام وشامل ليشمل أخذ شظية أو جزيىء بأى نوع من الخلايا الحية سواء بكتيريا أو فطر أو حيوان أو نبات دون النظر أيضاً لأن هذه الجزيىء من دنا يسبب تغيرات ملموسة فى الخية أم لا.

فى الطبيعة، لا يعتبر التحول البكتيرى طريقة رئيسية تكتسب بها البكتيريا الصفات. ومما يثبت ذلك أنه فى التجارب المعملية أنواع قليلة فقط من البكتيريا مثل أنواع من الجنس *Bacillus* والجنس *Streptococcus* هى التى يمكن أن يحدث لها تحول بكتيرى بسهولة. والدراسات والمكثفة على هذه البكتيريا أثبتت أنها تمتلك طرق متقدمة رفيعة المستوى **sophisticated mechanisms** لأخذ وإلتحام وثبات جزيئات دنا الدخيلة **DNA binding and uptake**.

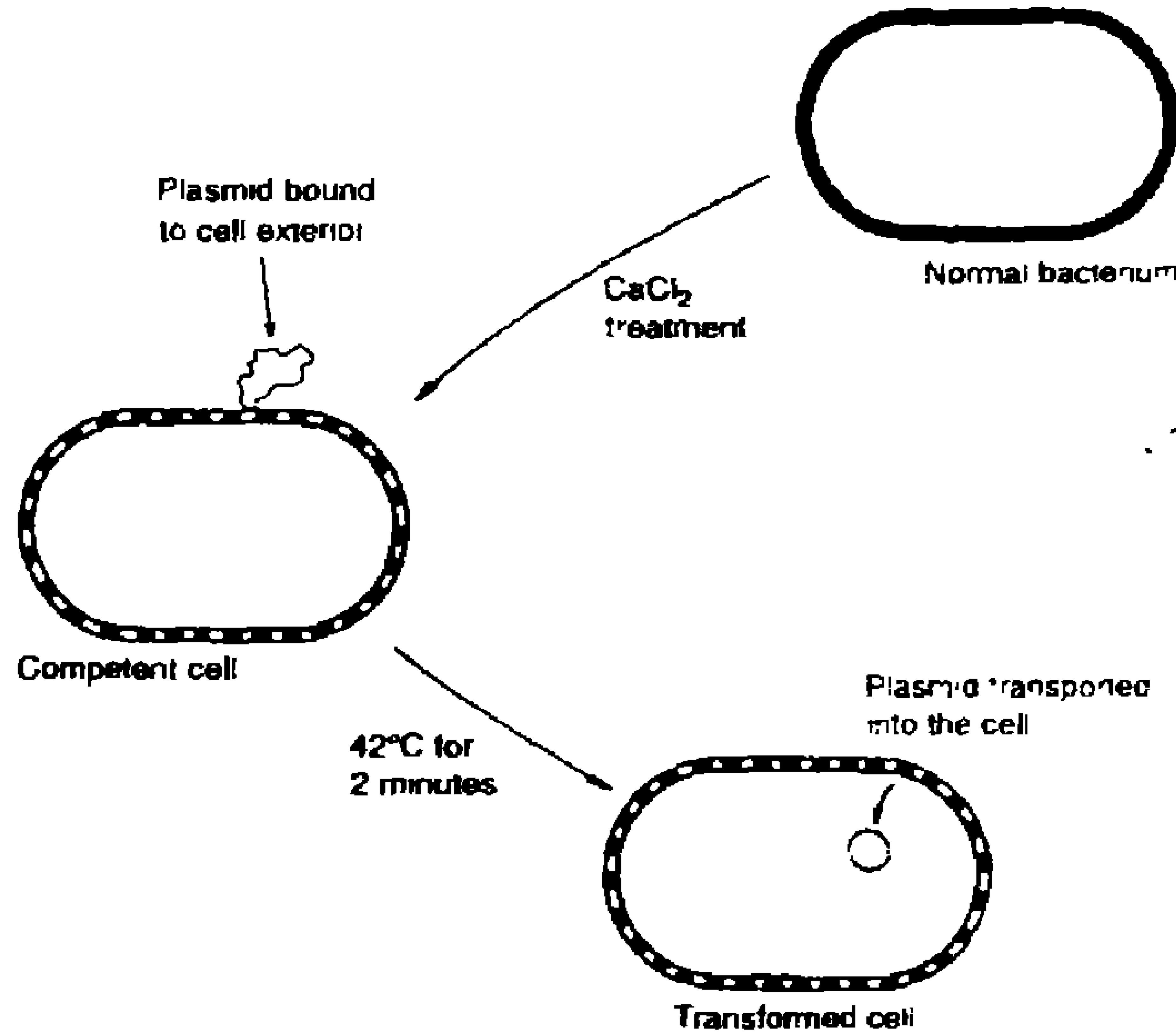
أغلب أجناس البكتيريا وأنواعها ومنها إ. كولاى تأخذ كميات محدودة من دنا فى الظروف الطبيعية. ولكى نستحث هذه الخلايا من البكتيريا وذلك لكى نجعلها قادرة على عمل عملية التحول البكتيرى بكفاءة عالية فلابد من معاملات خاصة فيزيائية أو كيماوية. والخلايا المعاملة بهذه المعاملات تسمى خلايا **competent** أى الخلايا المؤهلة أو القادرة أو ذات الكفاءة أو المتنافسة أو التنافسية.

كيفية تحضير الخلايا المؤهلة أو التنافسية

Preparation of Competent *E. coli* cells

ساعد إكتشاف الخلايا المؤهلة أو التنافسية على تقدم وعمل الجزيئات من دنا المعاد صياغتها **recombinant DNA technology**. وقد تم عمل ذلك فى بداية السبعينيات عندما لوحظ أن خلايا إ. كولاى والتى نقعت فى محلول ملحى بارد ثلجى **ice-cold salt solution** قادرة على أخذ دنا من البيئة بكفاءة الية عنه فى حالة الخلايا الغير معاملة. محلول ٥٠ ملليجزىء من كلوريد الكالسيوم يستخدم تقليدياً ولكن أملاح أخرى تستخدم بكفاءة أيضاً مثل كلوريد الروبيديم **rubidium chloride**. أما عن آلية حدوث ذلك فهو غير معروف. ويوجد إحتمال أن كلوريد الكالسيوم يسبب ترسيب دنا على السطح الخارجى للخلية أو أن هذا الملح مسئول عن بعض التغيير فى تراكيب جدار الخلية والذى يساعد على إلتحام دنا. أى أن النقع فى كلوريد الكالسيوم يؤثر فقط على إلتحام دنا ولا يؤثر على سرعة أو سهولة الدخول الفعلى

لدنا. حيث أنه عند إضافة دنا للخلايا المعاملة فإن دنا يظل ملتحم بالسطح الخارجى لخلية البكتيريا وحتى هذه المرحلة لا يدخل دنا إلى السيتوبلازم. الحركة الحقيقية لدنا إلى داخل الخلايا التنافسية أى الخلايا القادرة يمكن تنشيطه برفع درجة الحرارة إلى ٤٢ درجة مئوية. أما عن آلية عمل هذه المعاملة الحرارية غير معروف (شكل ٩٤).



شكل ٩٤: إلتحام وأخذ دنا بواسطة خلية تنافسية أى خلية قادرة أى خلية قابلة الإستحثاث.

إنتخاب الخلايا المتحولة أو المحولة Selection for transformed cell:

تحول الخلايا التنافسية أى الخلايا القادرة طريقة غير فعالة تماماً حتى بالرغم من دقة التحضير لعمل ذلك. بالرغم من أن انانوجرام من pU C8 يمكن أن ينتج عنه ألف إلى عشرة آلاف حالة تحول transformants فإن هذا مثل أخذ ٠,١% فقط من الجزيئات وأيضاً عشرة آلاف خلية متحولة تكون نسبة ضئيلة جداً من العدد الكلى للخلايا والتى توجد فى مزرعة تنافسية. يعنى ذلك أن لابد من وجود طريقة فعالة للتمييز بين الخلية التى أخذت بلازميد من آلاف الخلايا الخالية من البلازميد.

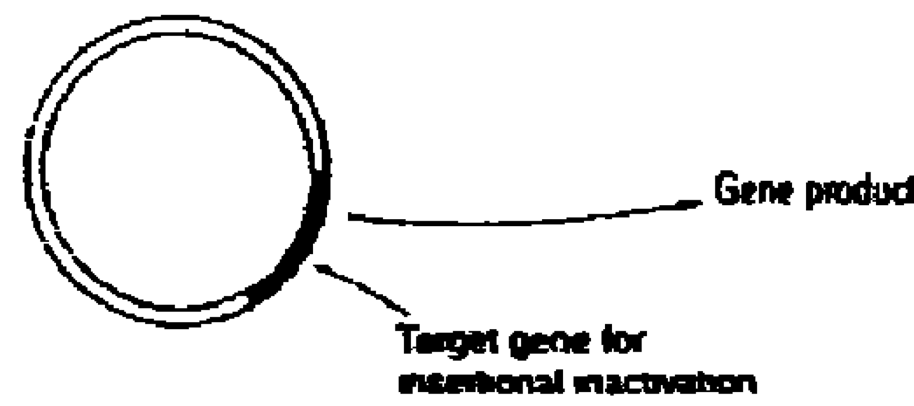
للإجابة على هذا السؤال يجب إستخدام معلم منتخب selectable marker محمول بالبلازميد. المعلم المنتخب عبارة عن جين يمد الخلية المحولة بصفة جديدة واضحة مميزة، وأن هذه الصفة لا توجد فى الخلايا العادية. ومثال جيد للمعلم المنتخب هو جين المقاومة للأمبسيلين فى البلازميد pBA322. بعد تجربة تحول بواسطة البلازميد السابق فإن خلايا البكتيريا إ. كولاى التى أخذت هذا البلازميد تصبح هى الوحيدة المقاومة للإمبسيللين والتتراسيكلين amp^R tet^R والتى يمكنها أن تنمو وتتكاثر على بيئة آجار تحتوى إمبسيللين وتتراسيكلين.

وهكذا يمكن التمييز بين الخلايا المحولة والخلايا الغير محولة، حيث أن الأخيرة لن تنمو على البيئة السابقة. عامة أغلب البلازميدات المستخدمة كناقلات وسيطة تحمل على الأقل جين لمقاومة إحدى المضادات الحيوية وهكذا يمكن عمل إنتخاب للخلايا المتحولة بتنميتها على بيئة آجار تحتوى المضاد الحيوى تحت الدراسة. هذه المقاومة للمضاد الحيوى لا تحدث فى التو ومباشرة بعد دخوله البلازميد إلى داخل خلية البكتيريا حيث أن البلازميد يحدث تأثيره نتيجة لإظهار صفة الجين والذى يخلق الإنزيم اللازم لتحليل أو معادلة المضاد الحيوى. عامة تعبير الجين عن وظيفته يحدث مباشرة بعد عملية التحول ولكنه يحتاج إلى زمن عبارة عن بضع دقائق لكى يكون الجين قادر على تخليق كمية كافية من الإنزيم قادرة على مقاومة التأثير الضار للمضاد الحيوى. ولهذا السبب فإن الخلايا المحولة لا تزرع مباشرة على بيئة الآجار الإنتخابية بعد المعاملة الحرارية ولكن أولاً توضع فى كمية قليلة أى حجم قليل من بيئة سائلة فى غياب المضاج الحيوى ويتم تحضينها على هذا الوضع فى حضان ٣٧ مئوية لمدة ساعة. وهكذا فإن تكاثر أى تضاعف البلازميد والتعبير عن صفاته تكون قد بدأت وتكون قد خلقت كميات كافية من الإنزيمات اللازمة لإستمرار حياة البكتيريا بعد زرعها بعد ذلك على بيئة آجار إنتخابية محتوية على المضاد الحيوى. بيئة الآجار تحتوى على ميكروحرام إمبسيللين لكل لتر، ١٥ ميكروجرام تتراسيكلين لكل لتر.

التعرف على الخلايا المعاد صياغتها

Identification of Recombinants

الزراعة plating أى تنمية خلايا البكتيريا على بيئة إنتخابية تمكن الباحث من التمييز بين الخلايا المعاد صياغتها والخلايا العادية. والمشكلة هنا فى الحالة هو كيفية التمييز بين المستعمرات المحتوية على خلايا معاد صياغتها والمستعمرات المحتوية على خلايا تحتوى على الناقل الوسيط المتحرك دون الشظية المطلوبة self-ligated vector molecules. فى الغالبية العظمى من الناقلات الوسيطة المتحركة ومثال ذلك فإن إدخال شظية دنا مثلاً فى البلازميد تفسد أحد الجينات الموجودة على الجزيىء destroys the integrity of one gene وهكذا يمكن التعرف على الخلايا المعاد صياغتها بالقاعدة السابقة حيث أن دخول الشظية المراد نقلها تفسد أحد الجينات المدروسة وهكذا لا يقوم هذا الجين بدوره فى الخلية الحية وهكذا يمكن التعرف على هذه الخلايا حيث أنها تحتوى على جين فاسد أو خامل ولا يؤدى وظيفته المعروفة للباحث. هذه الحالة تسمى التثبيط التداخلى insertional inactivation (شكل ٩٥) وسيتم شرحها بالتفصيل على الناقل الوسيط المتحرك البلازميد pBA322.

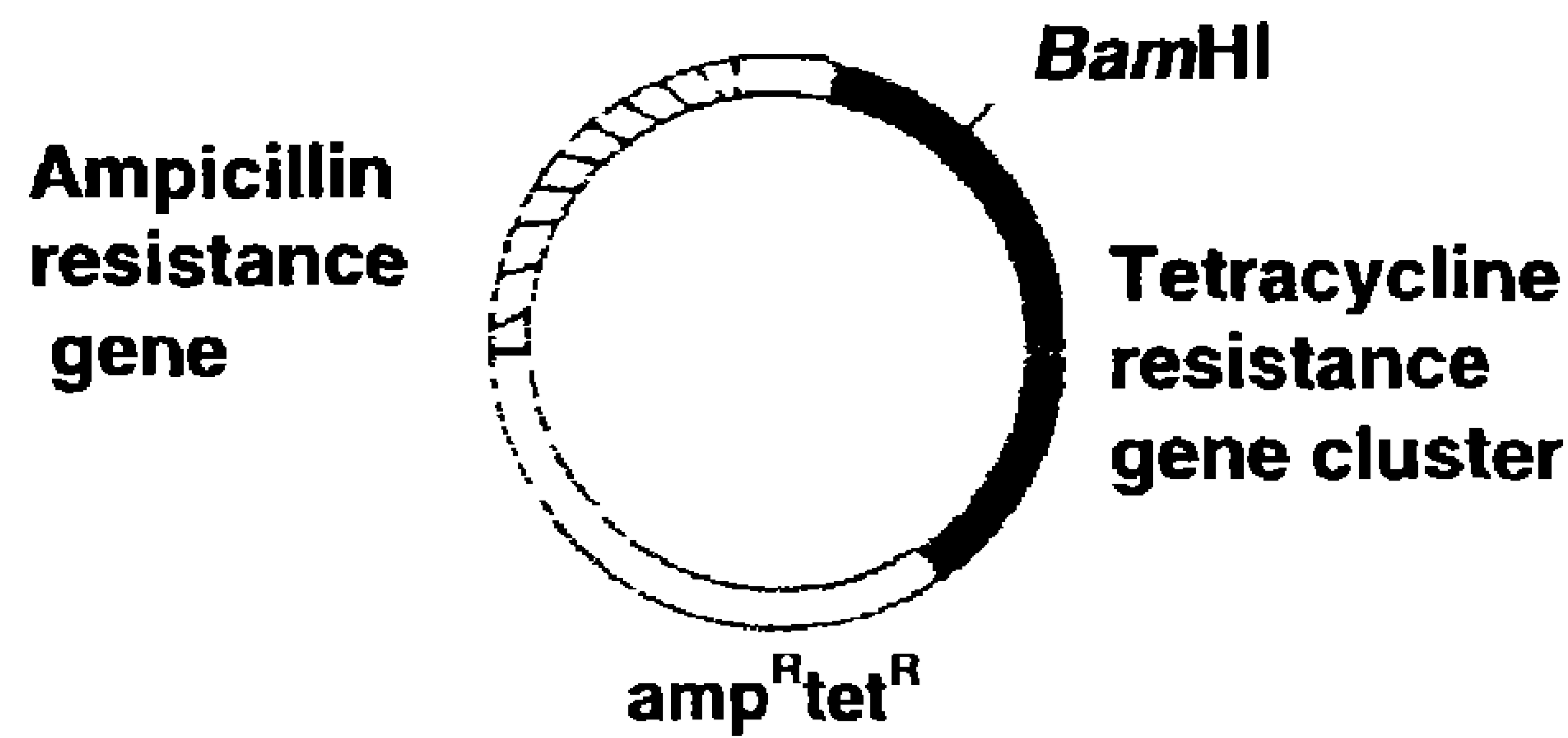


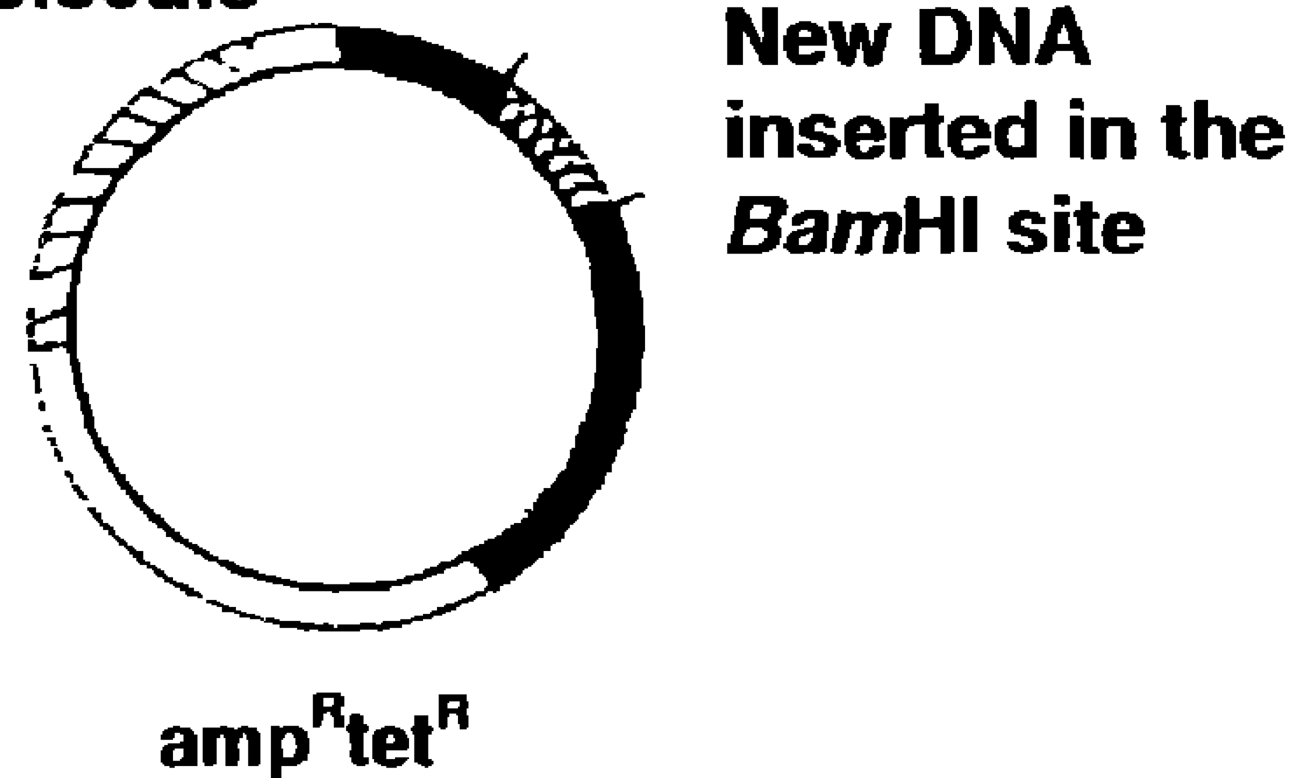


شكل ٩٥: (a) بلازميد عادى به جين مدروس وظيفته بالتفصيل وسيتم إفساده أو تثبيطه، (b) بلازميد به تثبيط تداخلى للجين تحت الدراسة ولا يقوم بعمله ولا يكون الناتج.

أنتخاب الخلايا المعاد صياغتها فى حالة البلازميد pBA322
Recombinant selection with pBA322

يحتوى البلازميد pBA322 على عديد من أماكن القطع المحدد الفريدة unique restriction sites والتى تستخدم فى شق أى فتح البلازميد قبل إدخال شظية دنا المطلوب دراستها أو المطلوبة. ومثال ذلك فإن إنزيم القطع المحدد *Bam* HI يقطع البلازميد فى موقع واحد محدد معين فى داخل عنقود من الجينات (مجموعة من الجينات) cluster of genes والتى تكون مسئولة عن المقاومة لمركبات التتراسيكلين. ولذلك فإن البلازميد المعاد صياغته أى الذى يحتوى شظية إضافية من دنا فى الموقع *Bam* HI (شكل ٩٦) يصبح غير قادر على جعل خلية البكتيريا مقاومة للتتراسيكلين، وهكذا تم فساد الجين وتثبيطه بواسطة التثبيط التداخلى insertional inactivation وهكذا تصبح خلايا البكتيريا المحتوية على البلازميد المعاد صياغته حساسة للتتراسيكلين ومقاومة للإمبسيللين (amp^R tet^s).



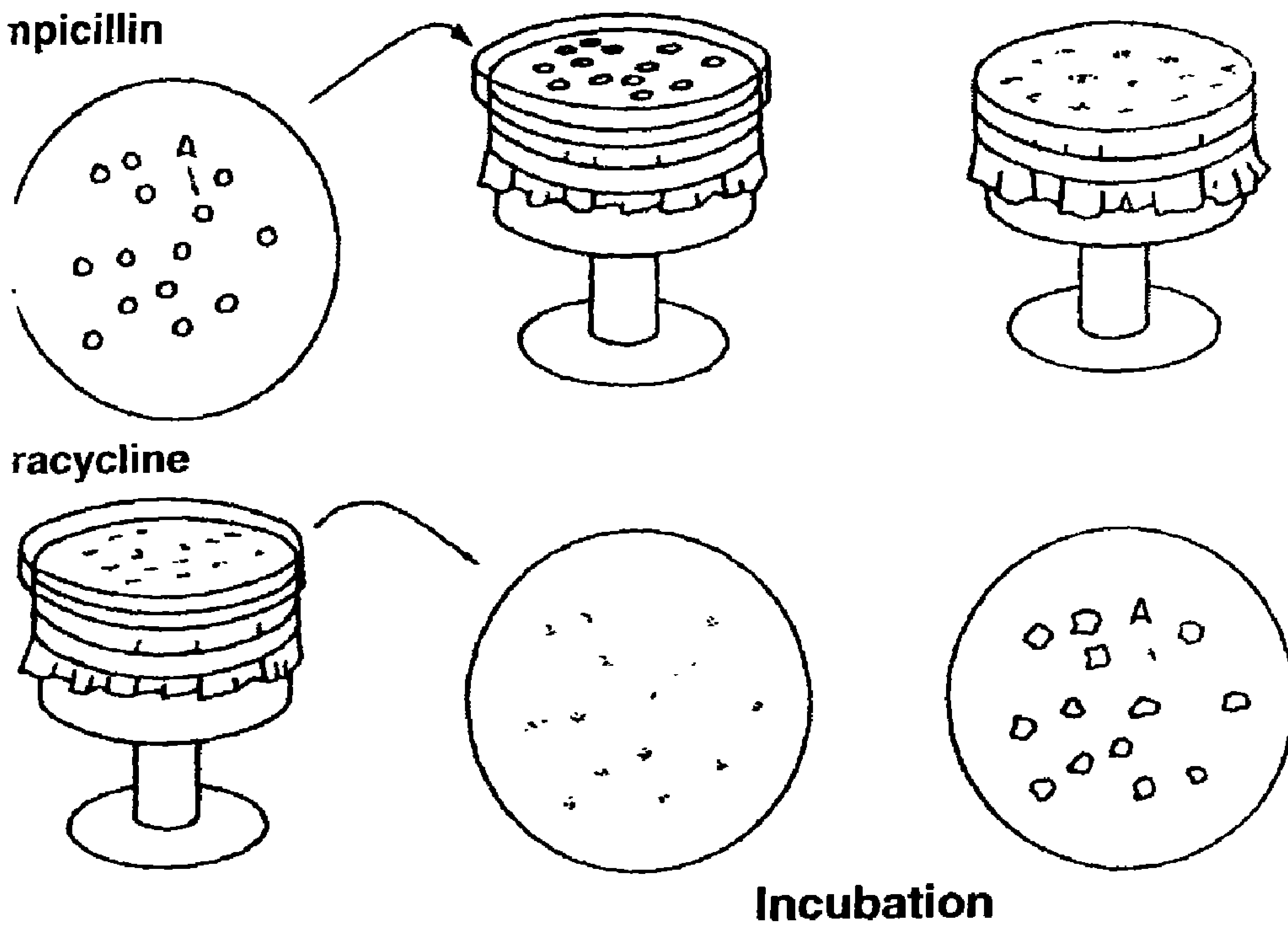


شكل ٩٦: (a) بلازميد pBA322 عادى، (b) البلازميد معاد صياغته ويحتوى شظية من دنا تثبط عمل جينات التتراسيكلين.

أما عن كيفية تحديد موقع مستعمرات البكتيريا المحتوية على خلايا معاد صياغتها وتحتوى الظية المطلوب نقلها كالتالى. بعد عمل التجربة السابقة فإنه يتم زراعة ناتج التجربة السابقة على بيئة آجار بها إمبسيللين وتترك فى الحضان مدة مناسبة وهكذا فإن المستعمرات النامية على هذه البيئة تكون جميعها مقاومة للإمبسيللين وتكون جميعها معاد صياغتها، وبالطبع الخلايا الحساسة للإمبسيللين لن تنمو (الخلايا العادية تكون حساسة للإمبسيللين أيضاً أما تحولها إلى خلايا مقاومة للإمبسيللين دليل أنها إكتسبت البلازميد). هذه الخلايا النامية المعاد صياغتها قليل منها يحتوى على البلازميد المعاد صياغته والغالبية العظمى منها احتوى على البلازميد العادى **self ligated plasmid**. والتعرف على المستعمرات المتكونة من خلايا معاد صياغتها تستخدم طريقة **replica plating method**. يمكن شرح هذه الطريقة بإختصار.

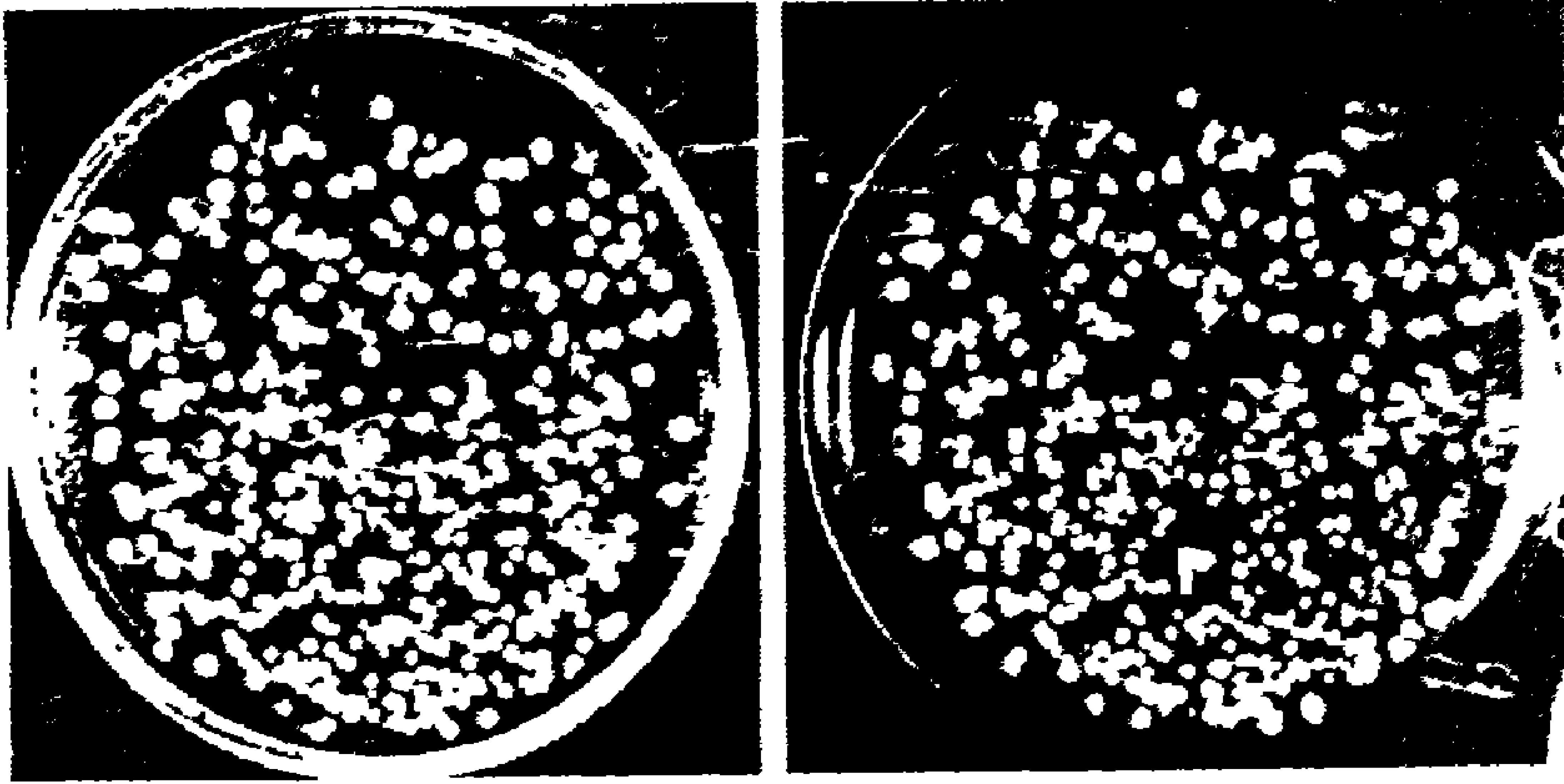
- يوضع على المستعمرات النامية فى بيئة الآجار ذات الإمبسيللين قماش قطيفة معقم وهذا القماش القطيفة يوجد على **support** يد معدنية أو خشبية أو على قمتها يوجد قرص معدنى أو خشبى.
- يتم تثبيت أى ربط القطيفة على القرص وهكذا يتم عمل التلامس بين القطيفة وسطح المستعمرات البكتيرية. وهكذا تترك كل مستعمرة بصمة لها على القطيفة وتوضح موقعها فى طبق بترى (شكل ٩٧).
- التلامس أى حك القطيفة على المستعمرات البكتيرية يكون برقة **gently** وكذلك بالنسبة للفطريات، أما فى حالة **streptomycetes** يكون الحك شديد **hard**. وهكذا بعد ذلك فإن هذا الطبق بترى يوضع فى الثلاجة. ثم على بيئة آجار فى طبق بترى آخر محتوية على التتراسيكلين يتم حك القطيفة على سطح البيئة.
- ثم يأخذ الطبق أو الأطباق وتضوع فى الحضان وبعد فترة مناسبة حوالى ٣-٧

أيام يتم فحص الطبق وملاحظة المستعمرات النامية ومقارنة موقع المستعمرات النامية بموقع المستعمرات النامية فى بية الإمبسيللين فى الطبق بعد إخراجه من الثلاجة. فإن الأماكن الخلية من المستعمرات فى الطبق الثانى وتحتوى على مستعمرات فى الطبق الأول، تكون هذه المستعمرات فى الطبق الأول هى المكونة من خلايا معاد صياغتها والمطلوبة (شكل ٩٧). وهكذا يمكن تطبيق هذه الطريقة فى هذه الحالة وفى حالات الطفرات الأخرى للبكتيريا والفطريات المختلفة.

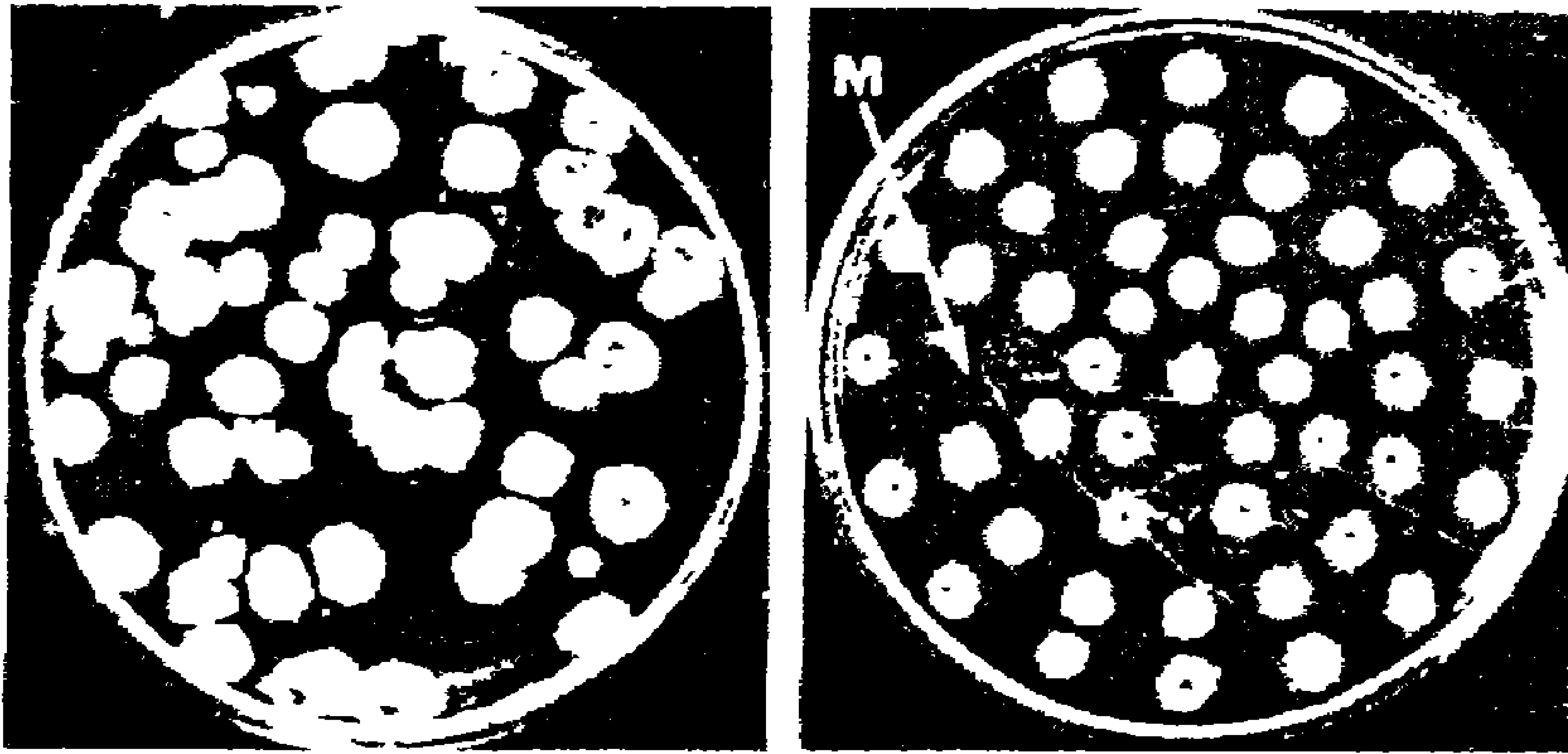


شكل ٩٧: طريقة replica plating.

وتستخدم هذه الطريقة بكثرة للتعرف وتحديد الطفرات فى الكائنات الحية الحقيقية مثل البكتيريا (شكل ٩٨) والطفريات (شكل ٩٩).



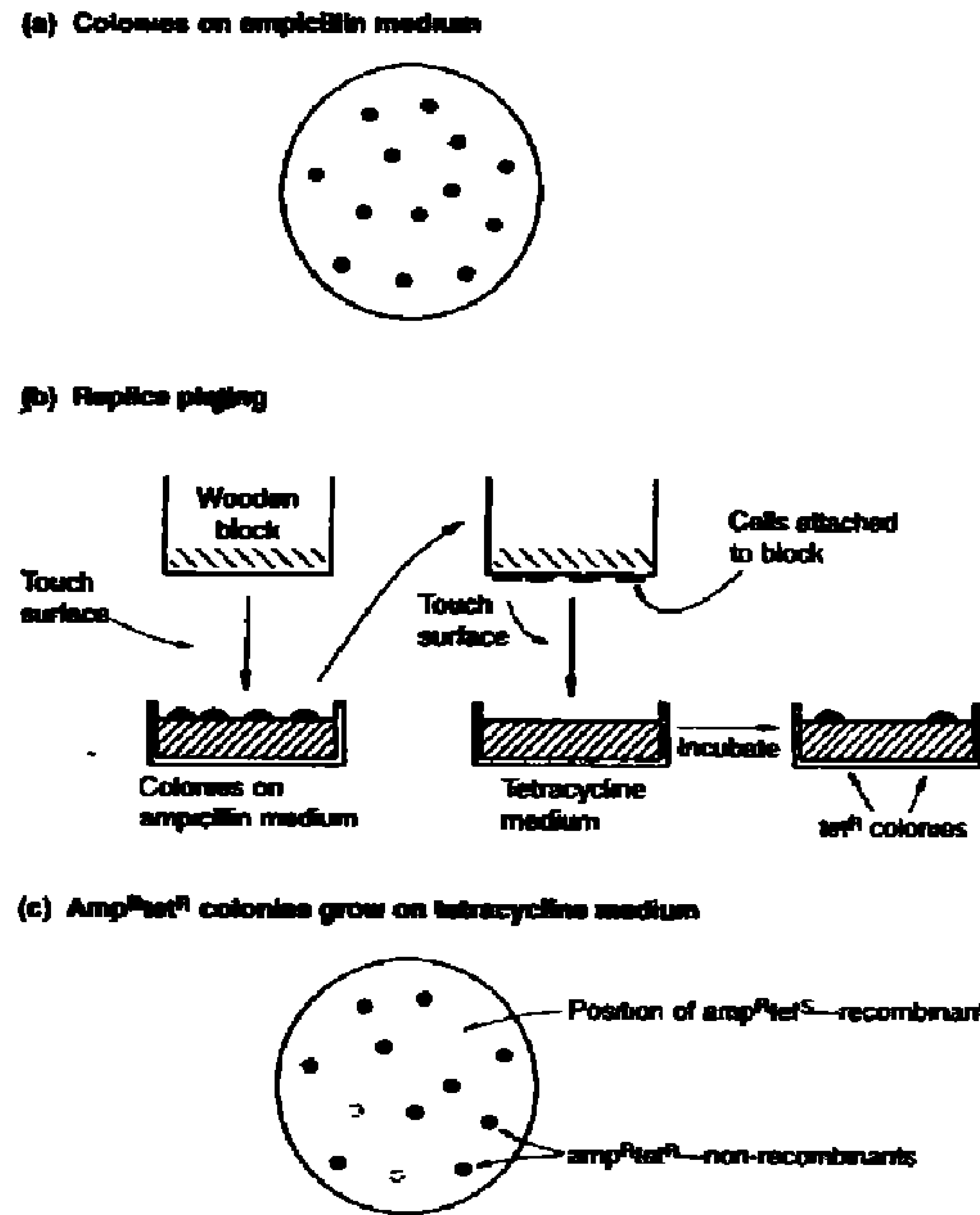
شكل ٩٨ : مستعمرات بكتيرية نامية على بيئة آجار وتم إستخدام طريقة replica plating تشير الأسهم إلى موقع المستعمرات البكتيرية المطلوبة وهى المعاد صياغتها أو المتطفرة في حالة دراسة الطفرات.



شكل ٩٩: مستعمرات فطر *Aspergillus nidulans* نامية على بيئة آجار وتم إستخدام طريقة **replica plating** يشير السهم إلى موقع المستعمرة الطفرة.

وهكذا يتم إستخدام نفس البيئة مرتين وبها مركب مختلف مرة واحدة فى طبقين مختلفين ولذلك سميت زراعة مستعمرات البكتيريا أو الفطر المكررة وهو شرح المصطلح الإنجليزى **replice plating** أى الزراعة (التنمية) المكررة. وهكذا فى حالة التجربة الخاصة بهذا الجزء فغن المستعمرات الحساسة للتتراسيكلين أى المحتوية على بلازميدات معاد صياغتها المطلوبة لا تنمو على بيئة التتراسيكلين ويمكن تحديد

موقعها بهذه الطريقة فى بيئة الإمبسيللين. أما المستعمرات النامية على طبق بيئة التتراسيكلين تحتوى على بلازميد pBA322 عادى أى لم يعاد صياغته فى المكان المطلوب (شكل ١٠٠).



شكل ١٠٠: تحديد موقع مستعمرات البكتيريا المكونة من خلايا محتوية على البلازميد المعاد صياغته بإدخال الشظية المطلوبة والتى سببت تثبيط جين المقاومة للتتراسيكلين بإستخدام طريقة **replica plating**.

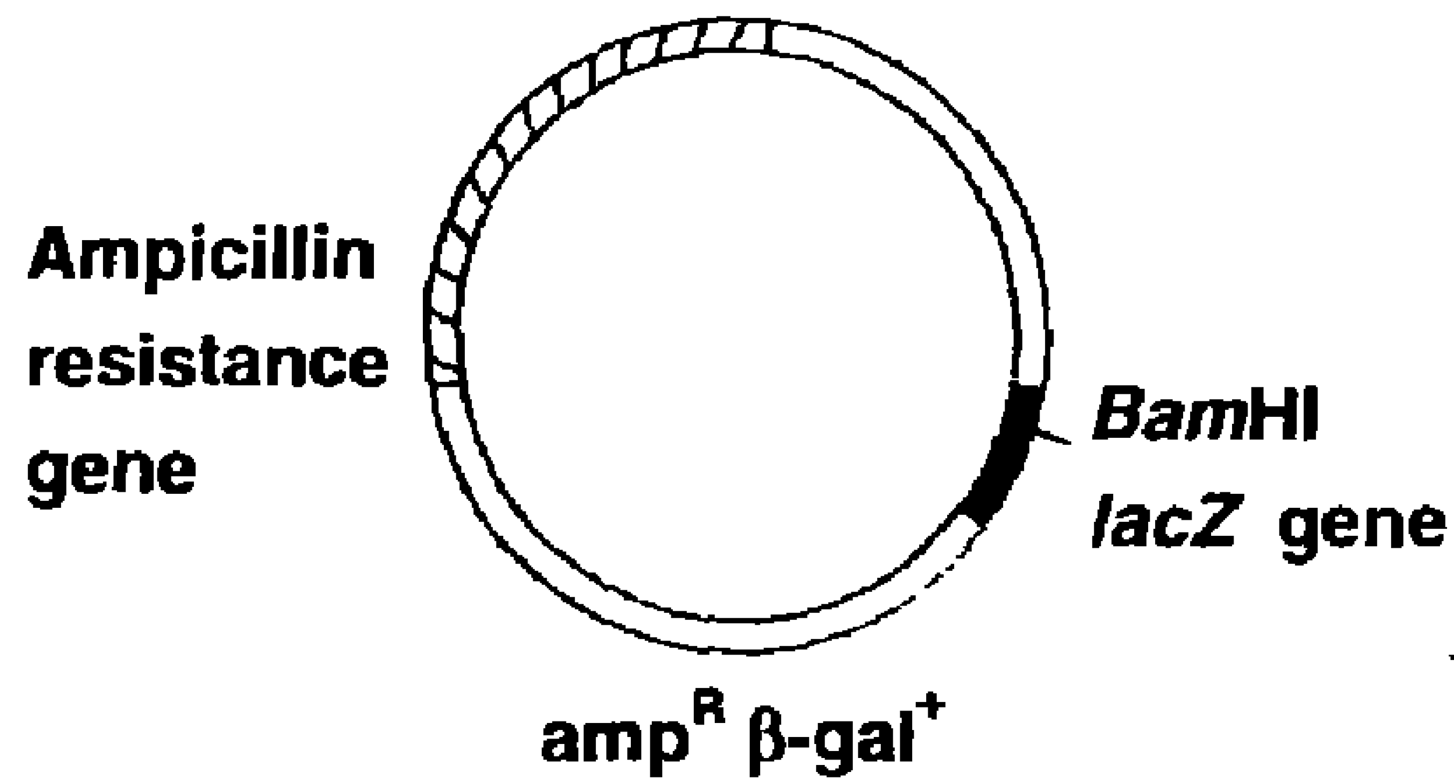
التثبيط التداخلى فى حالات غير المقاومة للمضادات الحيوية

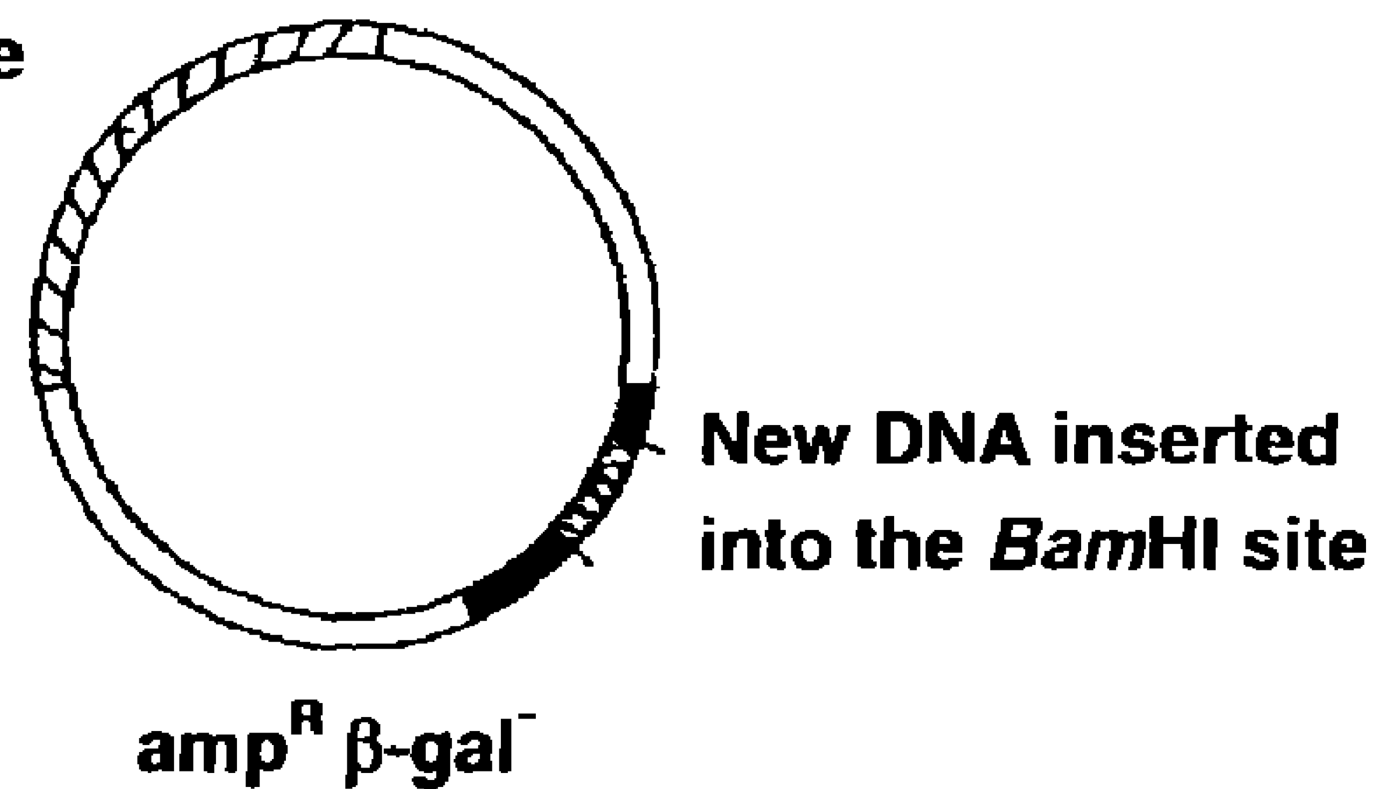
Insertional inactivation does not always involve antibiotic resistance:

بالرغم من أن التثبيط التداخلى (التداخل والتثبيط) لجينات المقاومة للمضادات الحيوية تعتبر طريقة هامة وفعالة وعملية للتعرف على الخلايا الماعد صياغتها فإنه توجد حالات أخرى للبلازميدات المستخدمة كناقل وسيط متحرك plasmid cloning vectors تستخدم حالات وأنزمة أخرى خلاف المقاومة للمضادات الحيوية. ومثال ذلك البلازميد pUC8 (شكل ١٠١) والذى يحمل جين المقاومة للإمبسيللين وجين آخر

يسمى lac Z' وهذا الجين الأخير مسئول عـن تخليـق جـزء مـن الإنـزيم بيتـا جالاكتوسيديز. التوطين بالبلازميد pUC8 أى إدخاله لخلية البكتيريا وبه تثبيط تداخلى (التداخل والتثبيط) للجين lac Z'. يمكن التعرف على حدوث التثبيط التداخلى فى هذه الحالة لأن خلايا البكتيريا الموطن فيها هذا البلازميد تكون غير قادرة علـى تخليـق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز (شكل ١٠١).

يعتبر بيتا جالاكتوسيديز واحد من سلسلة الإنزيمات المسئولة عن تحليـل سـكر اللاكتوز إلى جلوكوز وجالاكتوز. الجين المسئول عن تخليق هذا الإنزيم يوجد طبيعياً فى الطبيعية فى كروموسوم البكتيريا إ. كـولاى ويسـمى lac Z. وبعـض سـلالات البكتيريا لها جين محور من lac Z ينقصه جزء يسمى lac Z وهذا الجـزء النـاقص مسئول عن تخليق الجزء ألفا ببتيد α-peptide protion لهذا الإنزيم (شـكل ١٠٢). الطفرات، أى خلايا البكتيريا المتطفرة أى خلايا السلالات الأخيرة المحتوية على هـذا البلازميد هى الوحيدة القادرة على تخليق هذا الإنزيم لإنها تحتوى الجزء الناقص من الجين وهو الشظية lac Z' والذى يوجد فى البلازميد pUC8.





شكل ١٠١: البلازميد pUC8 والذى يستخدم كناقل وسيط متحرك، (a) بلازميـد عادى، (b) بلازميد معاد صياغته يحتوى شظية من دنا إضافية متداخلة فى الموقع *Bam*HI.

وهكذا فإن تجربة التوطين بهذا البلازميد pUC8 يمكن عملها ثم يتم الكشف على الخلايا الطفرة المعاد صياغتها وذلك بزراعتها (تنميتها) على بيئة آجار محتوية أمبسيللين ثم بعد ذلك زراعة المستعمرات الناتجة على بيئة آجار بها مصدر كربون عبارة عن سكر اللاكتوز. المستعمرات التى ستنمو على هذه البيئة تكون هى المستعمرات المطلوبة أى المكونة من خلايا معاد صياغتها، لأن هذه الخلايا هى الوحيدة القادرة على تحليل اللاكتوز وإستخدام الجلوكوز واللاكتوز كمصدر للكربون ولا يتم ذلك إلا فى وجود إنزيم بيتا جالاكتوسيديز. ولكن يوجد خلايا أخرى معاد صياغتها تقاوم الأمبسيللين amp^R ولكنها تكون غير قادرة على تحليل اللاكتوز -β gal^- (شكل ١٠٢). عامة الكشف عن بيتا حلاكتوسيديز سهل سواء وجوده أو غيابه.

عامة من السهل عمل الطريقة السابقة ولكن توجد أيضاً طريقة أخرى سهلة لونية. حيث يوضع فى البيئة مشابه للاكتوز lactose analogue يسمى X-gal وتركيبه 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-glactopyranoside والذى يتحلل بواسطة بيتا جالاكتوسيديز ليكون ناتج تفاعل ذو لون أزرق غامق. لو أن X-gal مضاف للآجار (مضاف أيضاً مركب inducer للإنزيم مثل isopropyl-thiogalactoside وإختصاره IPTG) وأيضاً يضاف إمبسيللين فإن الخلايا العادية الطبيعية الغير معاد صياغتها تكون قادرة على تخليق الإنزيم وتحليل اللاكتوز أو X-gel وتصبح ملونة باللون الأزرق الغامق بينما الخلايا المعاد صياغتها وفيها تثبيط وفساد للجين lac Z' تكون غير قادرة على تخليق الإنزيم وهكذا تكون المستعمرات بيضاء. هذه الطريقة تسمى Lac selection وملخصه فى الشكل (شكل ١٠٢).

إدخال دنا الفاج فى خلايا البكتيريا

Introduction of DNA Into Bacterial Cells:

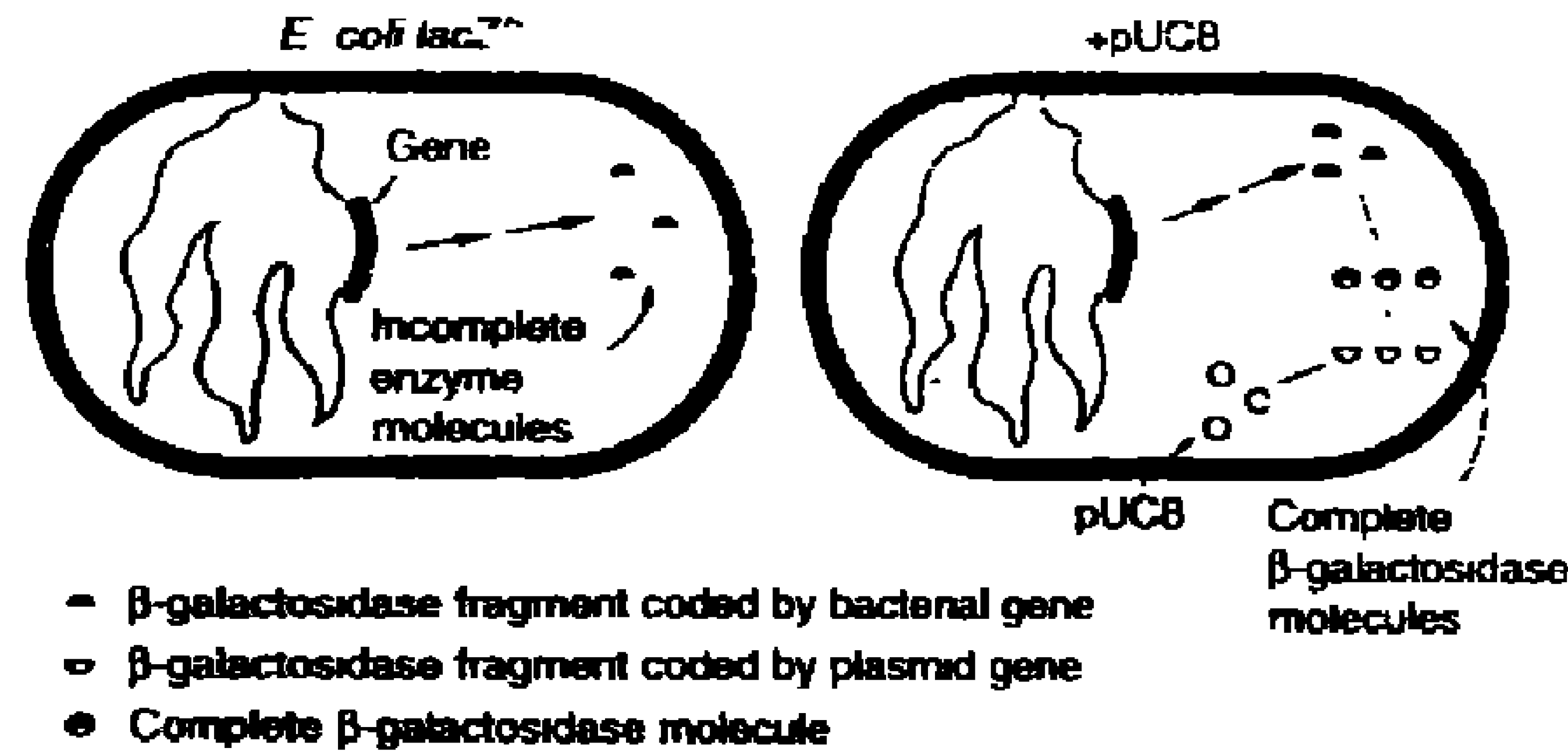
توجد ثلاثة طرق مختلفة يمكن بها تكوين دنا معاد صياغته بواسطة الفاج كناقل وسيط متحرك حيث أن الفاج يسهل عليه إختراق خلية البكتيريا طبيعياً يحدث ذلك بالطرق الآتية:

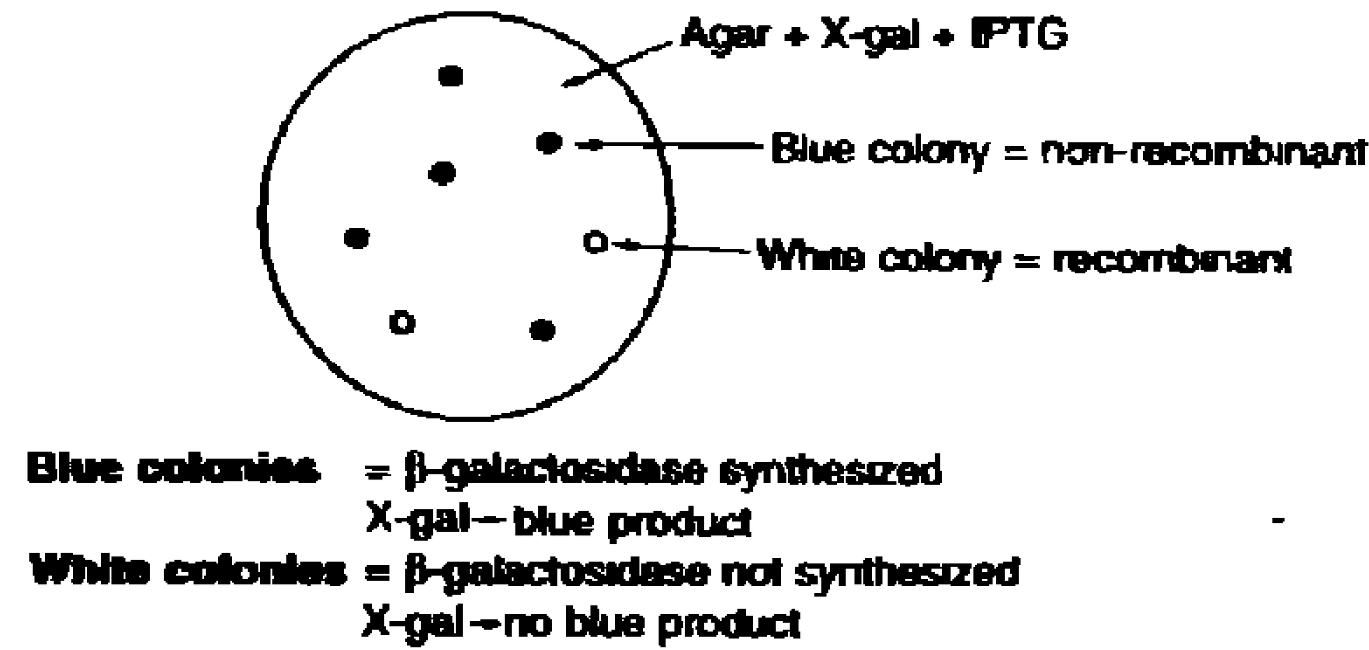
١ - التحول الفاجي Transfection:

هى طريقة مماثلة تماماً لحالة التحول البكتيرى transformation إلا أنها تستعمل الفاج بدلاً من البلازميد حيث أنه فى هذه الحالة يستعمل دنا الفـاج النقـى (المنقـى purified) أو يستخدم جزيىء الفاج المعاد صياغته ويتم خلطها بخلايا البكتيريـا إ. كولاى التنافسية أى القادرة أى المهيأة competent ويتم تعريض المخلوط لصـدمات حرارية heat-chock حيث تساعد هذه المعاملة فى دخول دنا إلى داخل خلية البكتيريا.

٢ - إنتقال الفاج من خلية بكتيريا إلى أخرى Transduction:

وهو عبارة عن إنتقال دنا البكتيريا من خلية بكتيريا إلى خلية أخـرى بواسـطة الفاج جزيئات الفاج التى تقوم بهذه العملية تسمى الجزيئـات الناقلـة transducing particles يوجد نوعين من transduction وهمـا العـام والخـاص generalized transduction and specialized transduction.

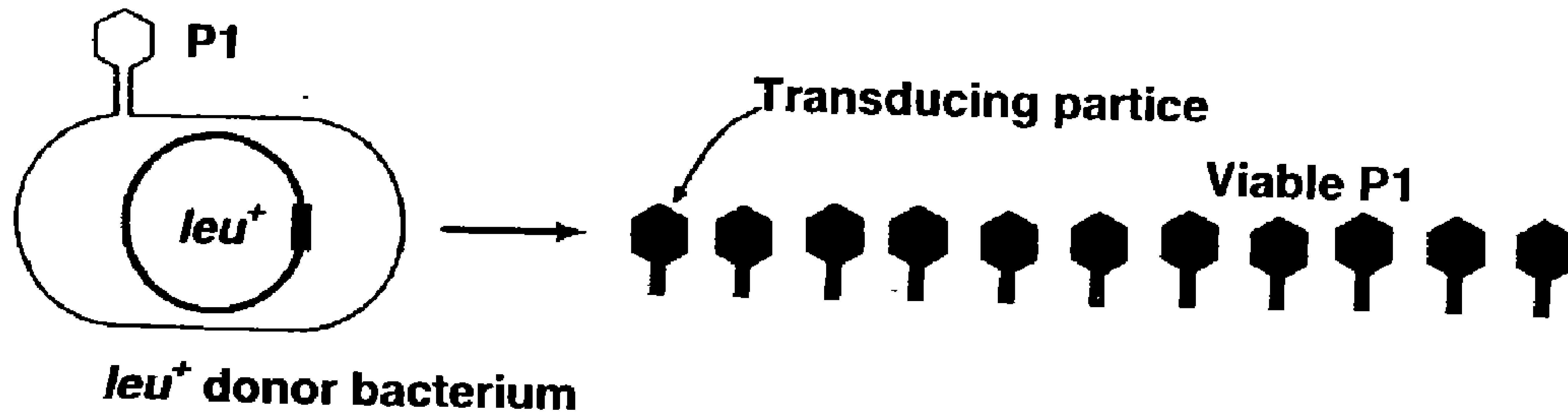




شكل ٢٠١: حالات التثبيط التداخلي للجين **lac Z'** بواسطة البلازميـد **pUC8**، **(a)** جينات البكتيريا والبلازميد تكمل بعضها لتخليق إنزيم بيتا جالاكتوسيديز، **(b)** التعـرف على الخلايا المعاد صياغتها بواسطة التنمية على آجار محتوى **X-gel** وأيضا **IPTG** (إنتخاب **Lac selection Lac**).

الفاج ذو النقل العام generalized transducing phage يكون بعض جزيئات من الفاج تحتوى على دنا البكتيريا فقط وأن هذا الجزء من دنا يشتق من أى جزء من الكروموسوم البكتيرى وليس من جزء معين (شكل ١٠٣).

الفاج ذو النقل الخاص specialized transducing phage ينتج عنه فاجات يتكون دنا الخاص بها من جزئين جزء من دنا البكيتريا وجزء من دنا الفاج وهكذا فإن جزيئ دنا الخاص بالفاج يحتوى على جينات من البكتيريا وجينات من الفيروسات، كما أن جينات البكتيريا تشتق من منطقة خاصة من الكروموسوم البكتيرى. من أمثلة النقل العام البكتيريا *Salmonella typhimurium* والفاج P22 ومن أمثلة النقل الخاص البكتيريا إ. كولاى والفاج لامدا. سيتم شرح transduction بالتفصيل فى كتاب تال.



شكل ١٠٣: الفاج P1 يصيب بكتيريا تعتبر مانحة لليوسين leu^+ donor وينتج عن ذلك نسل كله فاج P1 نشط حي وجزيء فاج واحد به دنا البكتيريا transducing particale.

٢– تعبئة الفاج صناعياً *in vitro* packaging:

نقل دنا الفاج لامدا بواسطة transfection تكون الطريقة غير الفعالة بدرجة كبيرة وذلك فى حالة مقارنتها مع خلايا بكتيريا مصابة بواسطة جزيئات فاج لامدا ناضجة mature. ولذلك فإنه يكون من المفيد تعبئة دنا الفاج لامدا المعاد صياغته فى جزيىء فاج لامدا صناعى تم عمله فى أنبوبة الإختبار.

يبدو لأول وهلة أن هذه الطريقة صعبة ولكنها فى الحقيقة سهلة ويمكن إنجازها بسهولة. تعبئة دنا يحتاج إلى عدد من البروتينات المختلفة يتم تكوينها وتخليقها تبعاً لشفرات موجودة بالجنيوم أى الطاقم الوراثى وذلك للفاج لامدا، ولكن يمكن إعداد وتحضير هذه البروتينات بتركيزات كبيرة فى حالة سلالات من الفاج لامدا ناقصة أو محور فيها جين أو أكثر **defective λ pgage strains**. يمكن عمل ذلك بطريقتين مختلفتين وهما:

أ – ـريقة السلالة المفردة Single-strain system:

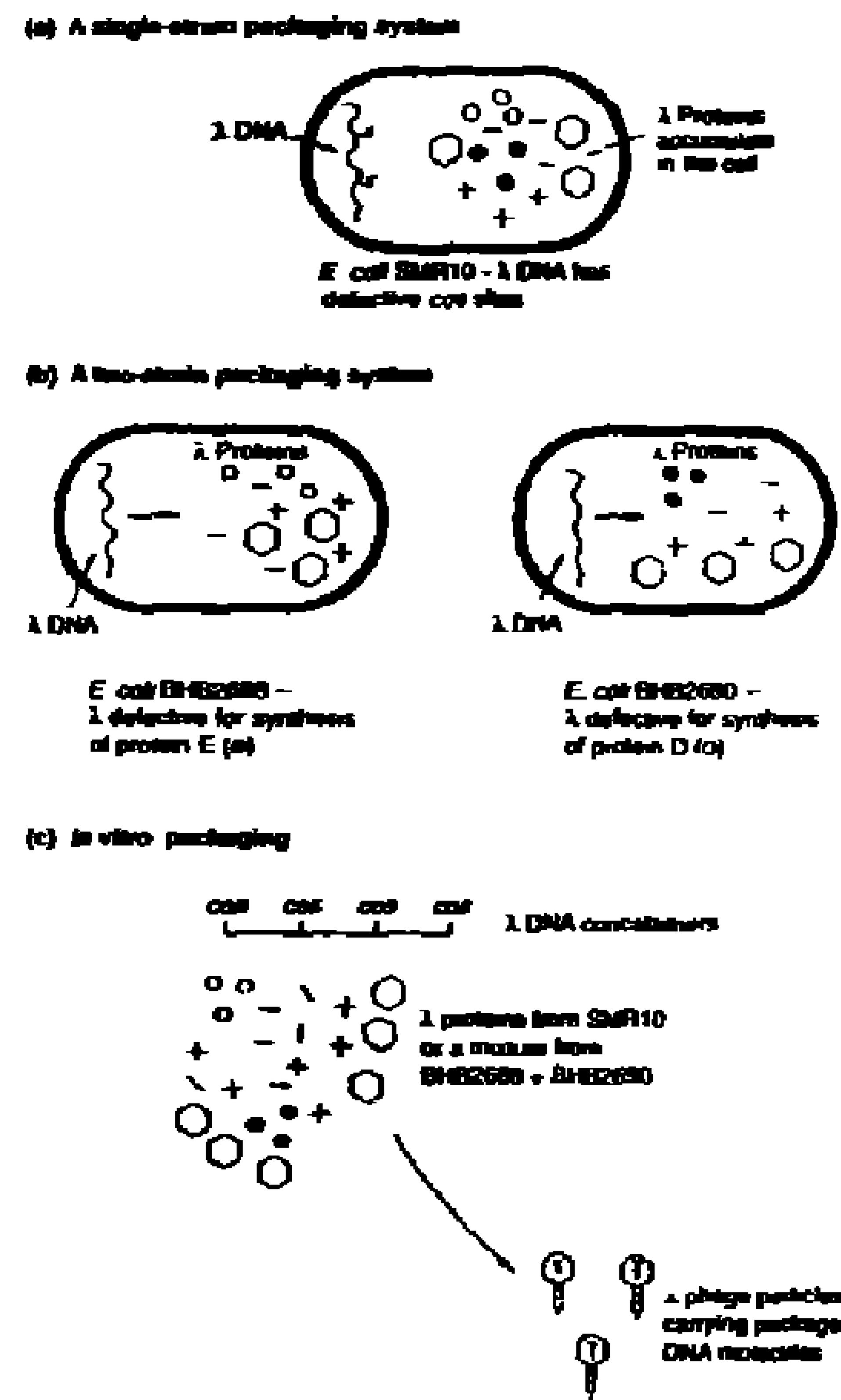
وفيها الفاج لامدا ذو الجين الناقص أو المحور يتميز بحدوث طفرة فى المواقع cos ونتيجة لذلك فإن هذه المواقع لا يتم التعرف عليها بواسطة إنزيم **endonuclease**، وهذه الإنزيم هو المسئول عن فصل الوحدات المتصلة المكونة لدنا **concatamers** أثناء تكاثر الفاج. وهكذا فإن هذا الفاج الناقص أى المحور أى المتطفر لا يمكنه عمل التكاثر لدنا ولذلك فإن يوجه جميع طاقة التخليق إلى تخليق جميع أنواع البروتين اللازمة لتعبئة دنا. وهكذا فإن البروتين يتجمع بكثرة فى خلية البكتيريا ويمكن تنقيته من مزارع البكتيريا إ. كولاى المصابة بحزيئات الفاج لامدا المتطفرة أى المحورة. وهذه البروتينات يمكن أن تستخدم صناعياً فى المعمل *in vitro* فى تعبئة جزيئات الفاج لامدا المعاد صياغتها (شكل ١٠٤).

ب – ـريقة السلالتين الناقصتين أى المحورتين Tow defective lambda strains:

فى هذه الطريقة نحتاج إلى سلالتين كل منهما يحمل طفرة فى جين واحد يكون خاص بتكوين أحد مكونات بروتين غطاء أى غلاف الفاج **phage protein coat**، حيث أنه فى سلالة واحدة تكون الطفرة فى الجين **D** وفى السلالة الثانية تكون الطفرة فى الجين **E** (شكل ١٠٤).

لا يمكن لكلا السلالتين أن تكمل دورة حياتها وتصيب خلايا البكتيريا إ. كولاى حيث أنه فى غياب أحد البروتينات نتيجة لطفرة فى الجين فإنه لا يمكن تكوين بروتين الغلاف **capsid structure**.

يلاحظ أن يتم تكوين وتجمع وتركيز للبروتينات الأخرى فى خلية البكتيريا عدا البروتينات الناقصة يتم عمل التعبئة الصناعية للفاج وذلك بخلط cell lysates للبكتيريا إ. كولاى لكلا السلالتين خلط جيد. يلاحظ أن أحد السلالتين مصاب بالفاج لامدا متطفر فى الجين المخلق للبروتين D ولذلك لا يخلق هذا البروتين وهكذا نتيجة لخلط السلالتين فإن يتم تكوين وتعبئة الفاج فى أنبوبة إختبار لأن البروتينات ستكون متكاملة (شكل ١٠٤).



شكل ١٠٤ : التعبئة للفاج صناعياً، (a) تخليق بروتين الغلاف capsid للفاج لامدا بواسطة خلية البكتيريا إ. كولاى SMR10 والتى تحمل الفاج لامدا الذى ينقصه أماكن cos sites cos نتيجة لحدوث طفرة فيها أى تم تحويرها، (b) تخليق بروتينات غير كاملة (أقل من العدد أى بها نقص) خاص بالغلاف capsid للفاج لامدا بواسطة سلالتين من البكتيريا إ. كولاى BHB2688، BHB2690، (c) خلط cell lysates لسلالتين البكتيريا السابقتين فى (b) مع بعضهما يكون نتيجته تكوين وتخليق البروتينات اللازمة للغلاف capsid كاملة تماماً ويتم تعبئة دنا لامدا فيها فى أنبوبة الإختبار.

فى كلا الحالتين السابقتين فإن جزيئات الفاج المعبأة صناعياً يمكن أن تستخدم فى إصابة خلايا البكتيريا إ. كولاى وذلك بإضافة معلق من جزيئات الفاج المعبأة صناعياً إلى مزارع البكتيريا وهكذا تحدث الإصابة بالفاج لامدا طبيعياً للخلايا وذلك بحقن دنا فى خلية البكتيريا.

كيفية التعرف على إصابة خلايا البكتيريا بالفاج بالعين المجردة بواسطة plawues على بيئة الآجار:

يمكن أن يكون الطور النهائى لدورة الإصابة بالفاج لخلية بكتيريا هو تحلل هذه الخلية البكتيرية cell lysis، لو أن الخلايا البكتيرية المصابة نشرت بالتساوى (وزعت بالتساوى) على بيئة آجار بعد إضافة الفاج أو بعد حدوث transfection بواسطة دنا الفاج فإن الخلية تتحلل ويمكن ملاحظة ذلك بواسطة رؤية plaques على سطح الآجار (plaque منطقة رائقة نسبياً ولا تحتوى على خلايا بكتيريا سليمة وحية) (شكل ١٠٥) كل plaque منطقة رائقة تتكون نتيجة لتحلل خلية البكتيريا بالفاج ثم ينتقل الفاج إلى خلايا أخرى مجاورة ليصيبها وهكذا تتكون منطقة من الخلايا الميتة تكون رائقة تسمى plaque.

من المعروف أن تكوين الفاج داخل الخلية البكتيرية يتكون عادى تلقائياً. وأن الوقت من حقن DNA إلى إنتاج جزيئات فاج جديدة قد يستغرق أقل من عشرون دقيقة. وتصبح الخلية البكتيرية مجرد غلاف يحتوى على مئات من جزيئات الفاج. ثم تنتج جزيئات الفاج إنزيم يسبب تحطيم جدار الخلية البكتيرية لتحرر جزيئات الفاج وتصيب خلايا بكتيرية جديدة.

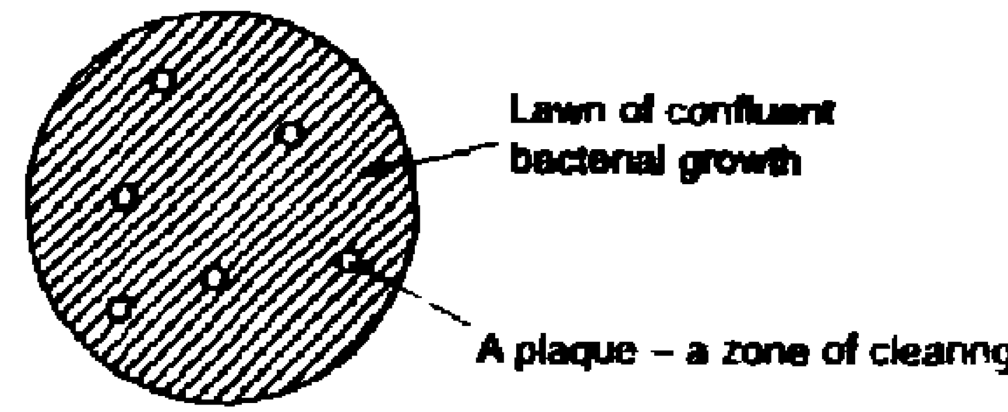
ينتج جزيىء فاج واحد داخل الخلية البكتيرية الواحدة مئات من الفاج. وكل فاج من المائة يصيب خلية بكتيرية ويكون مئات وعند تكرار هذه الحالة أربعة مرات فقط فإن فاج واحد يؤدى إلى موت ما يزيد عن بليون خلية بكتيرية. أما عند إضافة عدد قليل من الفاج إلى مزرعة بكتيرية كثيفة وقبل إنفجار أى خلية بكتيرية نتيجة للإصابة

بالفاج فإن يتم توزيع ونشر خلايا هذه المزرعة على سطح بيئة آجار مغذى. وفى خلال عشرون إلى ثلاثون دقيقة فإن الخلية البكتيرية الأولى المصابة تنفجر وتحرر جزيئات الفاج وهذه تصيب خلايا أخرى وهكذا تكرر العملية ولذلك فإنه تتكون تدريجياً حلقات من الخلايا الميتة حول أول خلية بكتيرية وهكذا تتسع الحلقات وفى هذه الأثناء أيضاً تتكاثر الخلايا البكتيريا غير المصابة وحيث أن عدد هذه الخلايا كبير بالنسبة لعدد الخلايا المصابة فإن الخلايا السليمة تكون طبقة وتغطى سطح الآجار. وبعد أن يغطى سطح البيئة تماماً بالخلايا البكتيرية تتوقف الخلايا عن التكاثر وأيضاً يتوقف الفاج عن التكاثر لأنه معتمد على الخلايا البكتيرية. وفى النهاية توجد بعض الحفر holes المستديرة فى سطح النمو البكتيرى وهذه تحتوى على خلايا ميتة نتيجة لتأثير الفاج وتسمى plaques. يعتبر كل plaque ناتج من فاج واحد عادة. يكون قطر plaque حوالى ٣-٤ مم. يمكن تعريف كلمة plaque أى مكان وجود الفاج وموت الخلايا البكتيرية وتكوين منطقة رائقة نسبياً.

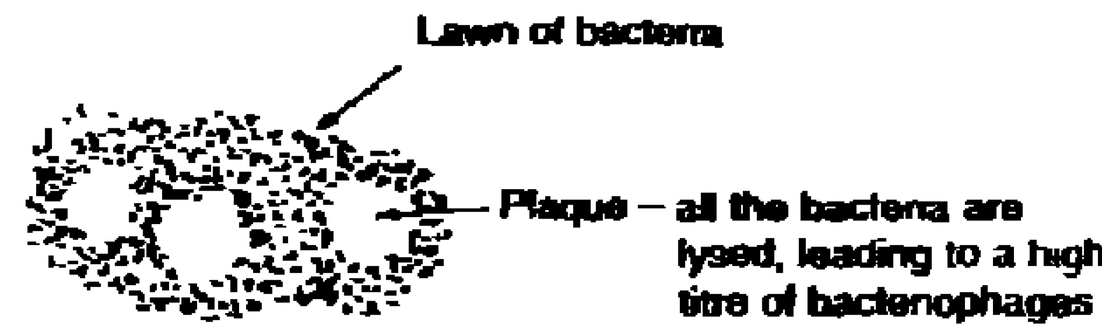
كلا من الفاج لامدا والفاج M13 يمكن أن يكون plaques وفى حالة الفاج لامدا تتكون true plaques تتكون نتيجة لتحلل الخلايا. وفى حالة plaques الفاج M13 فهى تكون مختلفة حيث أن الفاج لا يسبب تحلل خلايا البكتيريا وبدلاً من ذلك فإن الفاج يسبب نقص فى سرعة نمو الخلايا المصابة ويكون ذلك كاف لتكوين منطقة رائقة نسبياً فى المسطح البكتيرى bacterial lawn. بالرغم من أن هذه plaques غير حقيقية إلا أنها تكون مماثلة للـ plaques العادية (شكل ١٠٥).

النتيجة النهائية لتجربة توطين جين بواسطة الفاج لامدا أو الفاج M13 هو تكون plaques على سطح طبق الآجار. كل plaque واحد إشتق من خلية بكتيرية واحدة سواء transfected أو infected وهكذا فإنها تحتوى على أعداد كبيرة من الفاجات متماثلة فى تركيبها الوراثى تماماً identical phage particles. هذه plaques تحتوى على جزيئات فاج self ligated أو تحتوى على جزيئات فاج معاد صياغتها.

(a) Plaques on a lawn of bacteria



(b) Lytic plaques



(c) M13 plaques



شكل ١٠٥ : plawues الفاجات، (a) ظهور plaques على مسطحات البكتيريا lawn of bacteria، (b) plaques نتجت بواسطة فاج يحلل خلية البكتيريا مثل الفاج لامدا. يحتوى plaque على خلايا متحللة ميتة وجزيئات فاج لامدا، (c) plaques نتجت بواسطة الفاج M13 نتيجة لبطء فى سرعة نمو الخلايا. ويتكون plaque من خلايا بكتيريا بطيئة النمو وجزيئات فاج M13.

كيفية التعرف على الفاجات المعاد صياغتها

Identification of Recombinant Phages

توجد طرق عديدة يمكن بها التعرف وتمييز plaques المعاد صياغتها وفيما يلى أهم الطرق (شكل ١٠٦):

١ - تأثير مثبط تداخلى للجين *lac Z'* المحمول بالفاج الناقل الوسيط

Insertional inactivation of a *lac* Z' gene carried by the phage vector:

جميع أنواع الناقل الوسيط M13 وأيضاً بعض أنواع الناقل الوسيط لامدا تحمل نسخة من الجين *lac Z'*. إدخال دنا جديد فى هذا الجين يثبط تخليق الإنزيم بيتا

جالاكتوسيديز وتماماً كما فى حالة البلازميد الناقل الوسيط pUC8. يمكن تمييز دنـــا المعاد صياغته وذلك بزراعة البكتيريا على بيئـــة x-gal agar و plaques المحتويـــة على الفاجات العادية تكون زرقاء بينما المحتوية على الفاجات المعاد صياغتها تكون رائقة.

٢ – تأثير مثبط تداخلى للجين *cI* المحمول بالفاج لامدا

Insertional inactivation of the λ *cI* gene:

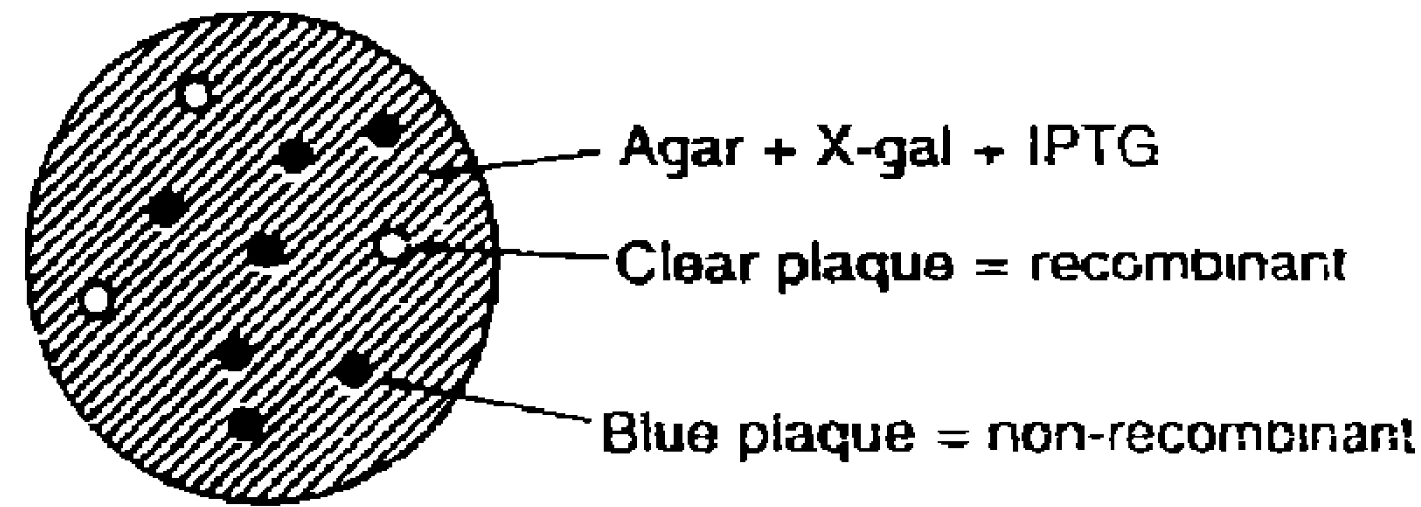
عديد من أنواع الناقل الوسيط لامدا لها مكان قطع محدد restriction site مميـــز فى الجين *cI* gene (الموقع على الخريطة ٣٨). إدخال دنا جديد فى هذا الجين يحدث له تثبيط ويسبب تغيير فى الشكل الظاهرى للبليك plaque. البلكيات plaques العادية تكون عكرة turbid بينما المحتوية على فاجات معاد صياغتها نتيجة للخلل فى تركيب الجين *cI* تكون رائقة clear. يمكن تمييز الفرق بين المستعمرتين بســـهولة بـــالعين المجردة الخبيرة.

٣ – الإنتخابات بإستخدام الشكل الظاهرى *Spi*:

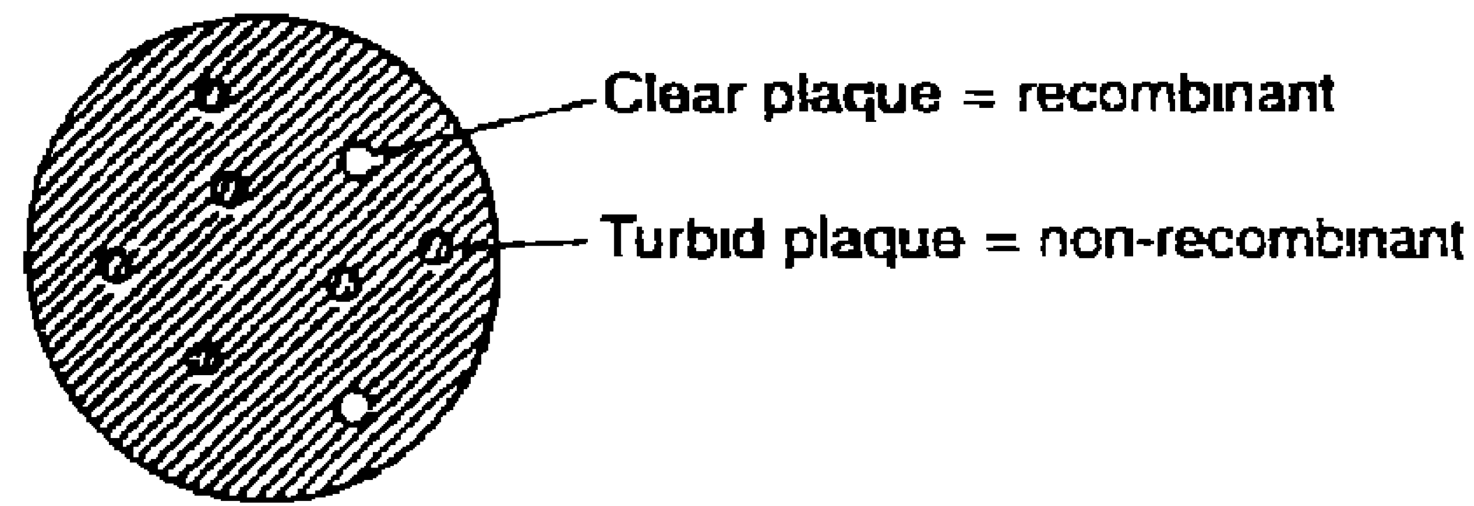
Selection using the *Spi* phenotype:

الفاج لامدا لا يمكنه إصابة البكتيريا إ. كولاى بسهولة وذلك فـــى حالـــة إحتـــواء خلاياها على جزء من المادة الوراثية لفاج مقارب له related يسمى P2. وفى هذه الحالة تعتبر لامدا عبارة عن Spi^+ أى تســـمى Spi^+ (أى تكـــون حساســـة للتثبـــيط بالبروفاج P2). أمكن تصميم وعمل بعض حالات من الفاج لامدا المســـتخدم كناقـــل وسيط متحرك ليصبح Spi^- وذلك بإدخال شظية من دنا أى أنه تم تحويل الفـــاج مـــن Spi^+ إلى Spi^- وتبعاً لذلك فإن دنا المعاد صياغته أى Spi^- يمكن أن يصـــيب خلايـــا تحمل البروفاجات P2 prophages P2. تستخدم هذه الخلايا كعائل لتجارب التـــوطين بواسطة هذه الناقلات الوسيطة المتحركة وهكذا يكون Spi^- هو الوحيد المعاد صياغته وهكذا فإن البليكات plaques تتكون فقط فى حالة هذه النـــاقلات الوســـيطة المعـــاد صياغتها Spi^-.

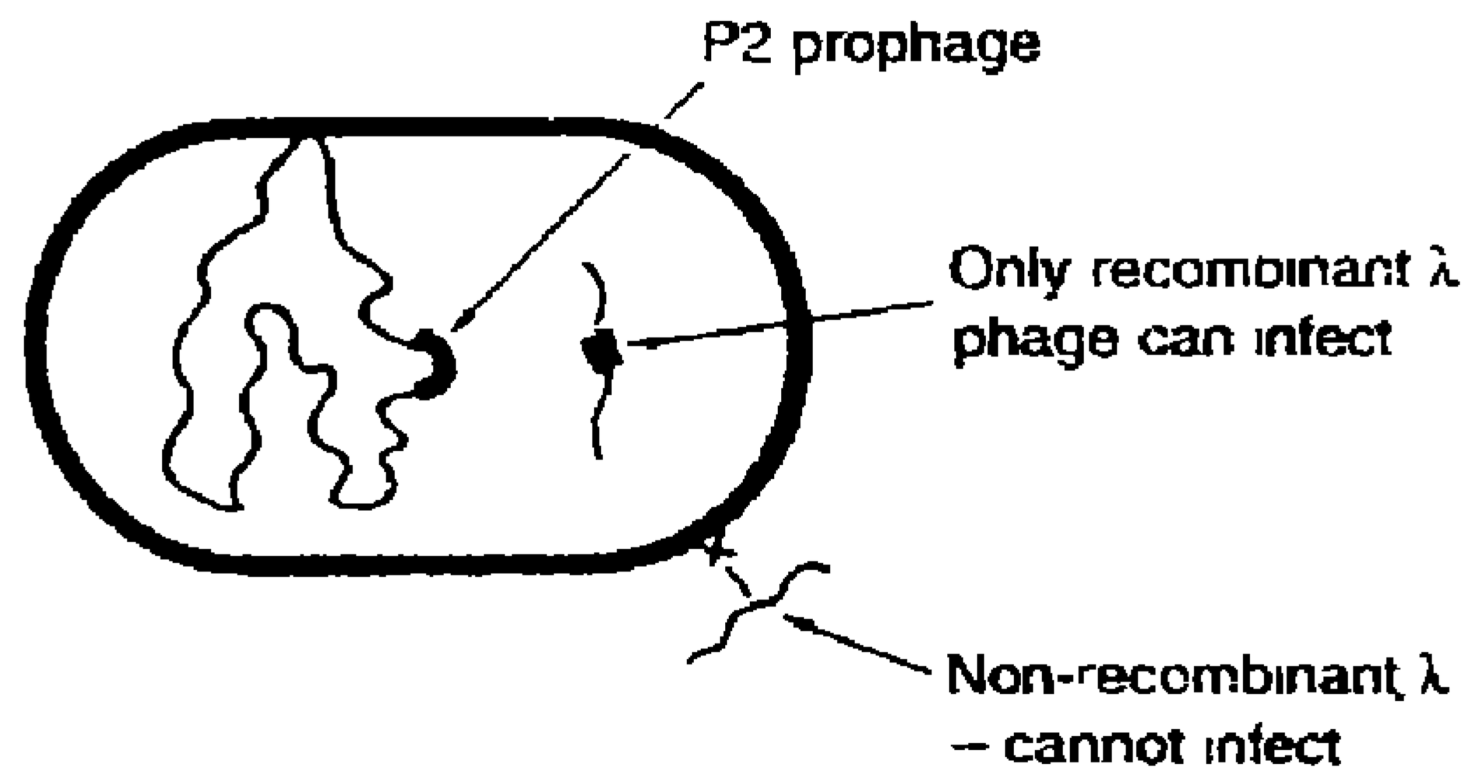
(a) Insertional inactivation of the *lacZ'* gene



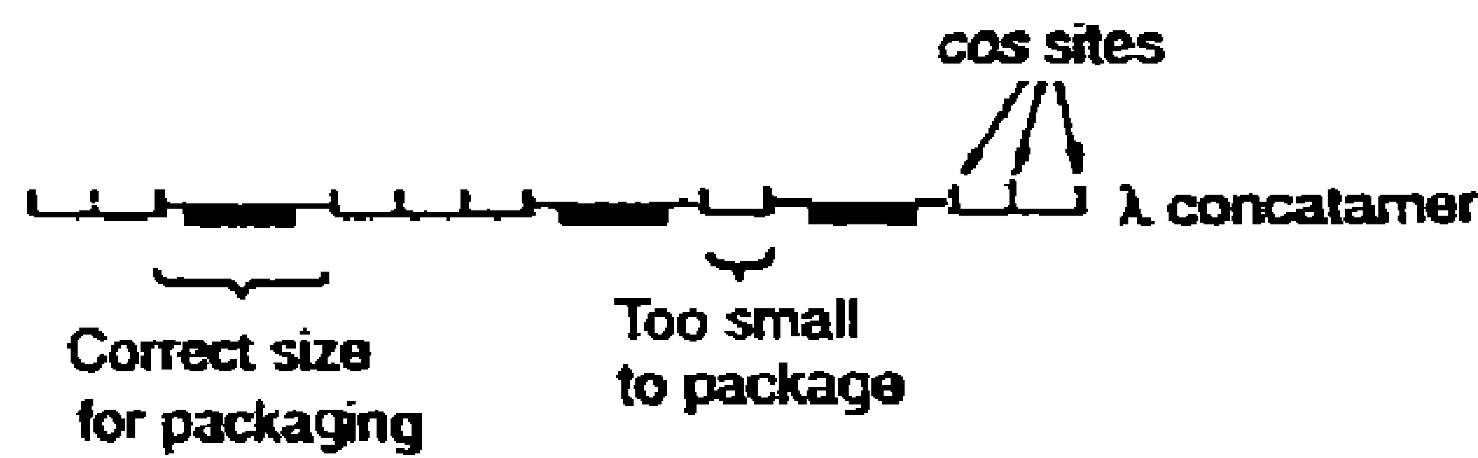
(b) Insertional inactivation of the λcI gene



(c) Selection using the Spi phenotype



(d) Selection on the basis of λ genome size



شكل ١٠٦ : الطرق المختلفة للتعرف على الفاجات المعاد صياغتها.

٤- الإنتخاب على أساس حجم الطاقم الوراثى للامدا:

Selection on the basis of λ genome size:

النظام الخاص بتعبئة الفاج لامدا فى أنبوبة الإختبار أى النظام الناتج عن التركيب الوراثى يعمل على تجميع جزيئات لامدا لتكوين الفاج الناضج لا يمكنه تعبئة جزيئات

دنا فى رأس الفاج إلا عندما يكون حجمه بين ٣٧ إلى ٥٢ كيلو قاعدة kb. أى أن جزء من دنا أقل من ٣٧ كيلو لا يمكن تعبئته. كثير من الناقلات الوسيطة المتحركة vectors من النوع لامدا تم بناؤها بإزالة قطع كبيرة من جزيئات دنا للفاج لامدا ولكنها أقل من ٣٧ كيلو قاعدة فى الطول (إزالة قطع من جزيىء دنا تكون عادة من المنطقة الوسطية لدنا الفاج والتى تتركز فيها الجينات الخاصة بإتصال وإنفصال دنا الفاج بالكروموسوم البكتيرى ولذلك فإن الفاج الناتج الناقص هذه المنطقة لا يمكنه عمل lysogeny ولكن يقوم بدوره lysis عادى، أى ينقصه القدرة على عمل lysogeny). هذه الدنا الناقصة لا يتم تعبئتها فى الفاج وتكوين جزيىء فاج ناضج إلا بعد إضافة جزء إضافى من دنا وهكذا يصبح الحجم النهائى للطاقم الوراثى أى الجينوم هو ٣٧ كيلو قاعدة أو أكثر. وهكذا يكون هذا الفاج الأخير المعاد صياغته هو القادر على التكاثر وإتمام دورة الحياة وبالتالى تمييزه عن الفاجات الأخرى.

التحول للخلايا الغير بكتيرية

Transformation of Non-Bacterial Cells

نحتاج إلى طرق مختلفة فى حالة إدخال دنا إلى خلايا الخميرة والفطريات والحيوان والنبات والإنسان عند إستخدام هذه الكائنات كعائل لتوطين الجين. عامة نقع الخلايا فى محلول ملح معين يفيد فقط فى قليل من أنواع البكتيريا بالرغم من أن المعاملة بواسطة كلوريد الليثيوم أو خلات الليثيوم تزيد من سرعة أخذ ودخول وإختراق دنا فى خلايا الخميرة ولذلك تستخدم بكثرة فى حالة خميرة الخباز أى خميرة البيرة ولكن فى الكائنات الحية الأخرى تستخدم طرق أكثر تقدماً.

التحول فى الخلايا المفردة Transformation of individual cells:

فى كثير من الكائنات الحية يكون جدار الخلية هى الحاجز الرئيسى فى إعاقة دخول دنا. ولذلك فى حالة زراعة خلايا الحيوان والتى بالطبع ينقصها جدار خلوى

يمكن تحويلها بسهولة easily transformed وخاصة عند ترسيب دنا على سطح الخلية بواسطة محلول فوسفات الكالسيوم (شكل ١١٢).

وفى حالة الخلايا التى لها جدر مثل النبات والفطريات ومنها الخميرة لابد من إزالة الجدار وذلك بإنزيمات تحلل هذه الجدران وهو متوفر بكثرة وبذلك يمكن الحصول على البروتوبلاست. يمكن فى بعض خلايا النبات والتى تكون كبيرة الحجم التخلص من الجدار بعمل بلزمة مبتدئة ثم قطع الجدر بآلة قطع دقيقة وبعد ذلك يتم تحرير البروتوبلاست العارى أى الخالى من الجدار (شكل ٧٣).

عزل البروتوبلاست المفرد من الخلية Protoplast isolation:

الخلية النباتية لها جدار خلوى صلب نسبياً يحيط بالبروتوبلاست. غشاء البلازماليما plasmalemma فى الخلية النباتية بالرغم أن له دور رئيسى فى تخليق الجدار الخلوى إلا أنه غير ملتصق بشدة بالجدار الخلوى. وهو مجاور للجدار الخلوى ويبطنه ولكنه غير ملتصق بشدة معه. الإتصال الفيزيائى بين البلازماليما والجدار الخلوى يتحكم فيه ضغط الإنتفاخ فى خلية النبات وعادة يوجد إتصال لأن الخلايا النباتية العادية توجد فى صورة غير مبلزمة ويكون لها ضغط أسموزى عالى نسبياً يجعل البروتوبلاست بما فيه البلازماليما يضغطان على الجدار الخلوى لتصبح الخلية نضرة. وفى حالة نقص الماء وذبول النبات يحدث للخلايا عكس ما سبق تماماً حيث ينكمش البروتوبلاست نسبياً ويتباعد البلازماليما نسبياً عن جدار الخلية ثم ينعكس الحال فى حالة توفر الماء. وفى حالة البلزمة يمكن أن تؤثر على البلازموديزماتا التى تصل الخلايا ببعضها وتسبب أضرار لها وفى حالة البلزمة الشديدة تفسد خيوط البلازموديزماتا. ولذلك فى حالة إزالة الجدار من الخلايا المبلزمة بلزمة إبتدائية فإنه يمكن إزالة جدار الخلية بسهولة جداً ويتحرر البروتوبلاست فى محلول البيئة المسببة للبلزمة (البيئة المسببة للبلزمة فى هذه الحالة تسمى plasmolyticum أو osmoticum).

أمكن بهذه الطريقة عزل البروتوبلاست من الجذور والأوراث والسيقان والأوراق والبتلات والثمار وغمد الريشة والأعضاء المخزنة وحبوب اللقاح والعقد الجذرية فى النباتات البقولية وأيضاً من نسيج الكالس ومن معلق خلايا النبات cell suspension. ونفس الفكرة تنطبق على الفطريات والطحالب لعزل برتوبلاست.

* أما عن طريقة تحرير البروتوبلاست من جدار الخلية فيتبع ما يأتى

Methods of protoplast release:

- جميع أنواع البروتوبلاست المحررة من أى نوع من الخلايا تشترك فى صفة واحدة هامة أنها هشة الأسموزية أى حساسة للأسموزية بدرجة شديدة osmotically fragile ولذلك قبل فصل الجدار لابد من تنظيم وتثبيت حالة الخلية بالنسبة لذلك stabilized with a solution ومعاملتها معاملة خاصة ويكون ذلك بواسطة غمرها فى محلول فوقى التركيز (زائد التركيز) hypertonic بدرجة مناسبة ولا يكون فوقى التركيز بشدة too hypertonic، لأنه إذا لم يتبع ذلك فإنه بعد إزالة الجدار سينفجر البروتوبلاست تبعاً لإزالة الضغط الجدارى.
- وبعد ذلك ولأنها بروتوبلاست محررة عارية (عديمة الجدار) فإن يجب معاملتها برفق وحرص شديد بإستمرار لأنها تكون غير قادرة على تحمل الصدمات الفيزيائية ومنها مثلاً الرج الشديد وغيرها حيث أن الجدار يقى البروتوبلاست من ذلك.
- يتم إزالة الجدار إما ميكانيكياً أو إنزيمياً وفى كلا الحالتين لابد أولاً من عمل بلزمة مبتدئة للخلايا بواسطة محلول من المانيتول mannitol أو السربيتول sorbitol. تفضل هذه المحاليل لأنها خاملة التحول الغذائى نسبياً metabolically relatively inert محاليل السكريات الأخرى مثل الجلوكوز والسكروز يتم إمتصاصها بالخلية وتحولها غذائياً بكفاءة عالية وخاصة أثناء الفترات الطويلة نسبياً اللازمة للمعاملة بالإنزيمات. وفى حالة السكريات

الأخيرة يكون البروتوبلاست المعزول غير ثابت عند زراعته بعد ذلك instabikity during subsequent culture. أما عن الضغط الأسموزى المناسب فإنه لابد من عمل تجارب لضبط التركيز لأنه يختلف بإختلاف الأنسجة ومثال ذلك أن بروتوبلاست خلايا أوراق التبغ واللوبيا يتم معاملها بمحلول ١٣% (٠,٧ جزيىء) من المانيتول بينما بروتوبلاست خلايا كالس التدرن التاجى لنبات فيرجينيا الزاحف Virginia cr-eeper (*Parthenocissus tricuspidata*) يستعمل محلول ١١% من المانيتول. البروتوبلاست المعزول الحر الطازج يجب أن يكون كروى عدا بروتوبلاست العقد الجذرية. محلول تحت التركيز under plasmolysis يسبب إنفجار البروتوبلاست ومحلول فوقى التركيز بشدة over plasmolysis يسبب مظهر متعرج ملتو crenate appearance.

* تحرير البروتوبلاست ميكانيكياً Mechanical isolation يمكن عمله كما يأتى:

- يتم قطع الخلية المبلزمة بموس حاد ويتم تحرير البروتوبلاست من الجدار المقطوع وذلك بطرق عديدة ومنها الضغط برفق على النسيج gently squeezing أو خفض تركيز المحلول الفوقى التركيز تدريجياً والذى يحيط بالبروتوبلاست بدرجة معتدلة ويتحرر من الجدار المقطوع. وفى الحقيقة أن هذه الطريقة معروفة منذ زمن طويل حيث يعتبر J. Klerker عام ١٨٩٢ أول من ذكر تحرير البروتوبلاست من الخلية من نبات يسمى بالترجمة الحرفية العسكى المائى water soldier (*Stratiotes aloides*) بالطرق الميكانيكية.

إستخدمت هذه الطريقة بعد ذلك فى عزل البروتوبلاست من خلايا حراشيف بصلة البصل ومن الجدار الثمرى الأوسط mesocarp للخيار ومن أنسجة مخزنة. عامة من عيوب هذه الطريقة أن المحصول من البروتوبلاست قليل، وأنها تلائم الخلايا الكبيرة فقط.

* تحرير البروتوبلاست إنزيمياً Enzymatic isolation:

وهو عبارة عن إزالة جدار الخلايا بواسطة إنزيمات التحليل المائى hydrolytic enzymes. الجدار الإبتدائى فى النباتات الراقية يتكون من هيكل من السيليلوز. فى حالة الخلايا الصغيرة والتى لم تتشكل بعد والتى توجد مثلاً فى منطقة الإستطالة وسنأخذ مثلاً لها جذور نبات ذرة صغير فإن كمية السيليلوز فى الجدار الخلوى تكون ٢٥ إلى ٤٠% من الوزن الجاف. السكريات الأحادية الأخرى خلاف الجلوكوز الذى يدخل فى تركيب السيليلوز هى مانوز وجالاكتوز وزيلوز يحدث لها بلمرة لتعطى مانان وجالاكتان وزيلان وهى سلاسل قصيرة يتكون منها الهيميسيليلوز والذى يكون ٥٠% من الوزن الجاف للجدار الخلوى، يوجد فى الجدار أيضاً دهون ٥-١٠% من الوزن الجحاف وبروتين حوالى ٥% من الوزن الجاف. هذه النسب بين المكونات المختلفة تختلف بتشكل الخلايا وعادة تزداد كمية السيليلوز وأيضاً بكبر السن. والسيليلوز يكون ٩٤% من الوزن الجاف لجدار شعرة القطن الناضجة. فى بعض أنواع الخلايا يقل تركيز الهيميسيليلوز والبروتين والدهون أو قد يختفى ولكن يزيد تركيز كل من اللجنين والبلمرات العطرية مثل phenylpropane with p-coumarylic and sinapylic acid أثناء تشكلها. بين الخلايا توجد الصفيحة الوسطى والتى تتكون أساساً من حامض البكتيك والذى يوجد فى صورة أملاح الكالسيوم والمغنيسيوم وهو المسئول عن ربط ولحم الخلايا ببعضها.

التركيب الكيماوى للجدار الإبتدائى والصفيحة الوسطى يجعلها قابين للتحلل بالإنزيمات مثل السيلوليز والهيميسيليز والبكتينيز. وهذا الإختلاف فى تركيب جدر الخلايا يحتاج خليط من إنزيمات مختلفة ذات تركيزات مختلفة وذات فترة حضانة مختلفة وذلك يختلف لكل نسيج. أنسجة الورقة تحتاج المعاملة بمخلوط من إنزيمات السيليلوليز والبكتينيز وذلك ليتحرر البروتوبلاست. فى بعض الثمار يحدث تحلل طبيعى للصفيحة الوسطى أثناء النضج ويسبب تحرر وإنفصال الخلايا ومن هذه الخلايا يمكن تحرير البروتوبلاست بواسطة إنزيم السيليوليز. وفى حالة الثمار ذات

المحتوى البكتينى المرتفع يحدث تحرر للبروتوبلاست بواسطة البكتينيز. بعض جـدر الخلايا يمكن إزالتها بالإنزيمات ذات التحليل المائى والبعض الآخر يكون مقاوم تماماً للتحلل بالإنزيمات. أغلب الإنزيمات المحللة لجدران الخلايـا والتـى تسـتخدم لهـذا الغرض تستخلص من الفطريات. تحرير البروتوبلاست من خلايا قمة الجذر للطماطم بواسطة Cocking عام ١٩٦٠ بإستخدام السيليوليز، وهذا الإنزيم تم إنتاجه بواسطة ترسيب البروتين من راشح مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria*، وكان هذا أول إنجاز فى هذا الصدد وهو إستخدام الإنزيمات فـى تحريـر بروتوبلاسـت الخلايـا. إنزيمات السيليليز المستخرجة من الفطريات موجودة تحت أسماء كثيرة تجارية مثل Cellulase Onozuka، Meicelase P، Driselase G، Rhozyme وهى بالإضافة لهـا نشاط إنزيم الهيميسيليليز أيضاً.

وعامة تحضير إنزيم السـيليليز صـناعياً سـهل نسـبياً. يـتم تنميـة الفطـر *Trichoderma viride* على بيئة نخالة حبوب القمح wheat bran مع وجود تهويـة جيدة وذلك فى حضان على درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية لمدة ثلاثة أيام. يتم أخـذ المزارع ويتم عصرها وغسيلها ثم ترشح ويوجد إنزيم السيليليز فى الراشـح ويـتم ترسيبه بواسطة كبيريتات الأمونيوم. يتم عمل إزالة للملوحة de-salted للإنزيم ثـم التركيز ثم الرش – التجفيف spray-dried ليتكون مسحوق لونه بنى فاتح. ومن هذه الطريقة المبسطة فإنه يمكن الحصول على تحضيرات تجارية من الإنزيم ولكن تكون بعض التحضيرات غير نقية تماماً بل ملوثة بشوائب عبارة عن إنزيمات أخرى مثـل سيللوبييز وجلوكانيز وزيلينيز وليبيـز وفوسـفوليبيز ونيـوكلييز وشـيتينيز، B1-3gluconase (الإنزيمين الأخيرين يستخدمان فى إزالة جدر خلايا الفطر) والبكتينيـز. يمكن الحصول على بروتوبلاست لكثير من الفطريات الآن.

أما عن إنزيمات pectinases فإنها تنتج بواسطة أنواع الفطر *Rhizopus* وتبـاع تحت أسماء تجارية منها Macerozyme، R10 Pectinol. بـالرغم مـن أن أغلـب الإنزيمات المحللة لجدار الخلية تستخلص من الفطريات فإن العصارة المعدية للقواقع

الرومانية Roman snails (*Helix pomatia*) تستخدم فى ذلك أيضاً. ويتم عمل ذلك بسحق غدة معينة وهى mid-intestinal gland ويتم الحصول على إفرازها من أمعاء قواقع صائمة (غير مغذاة) جائعة ومقتولة حديثاً. بعض المعامل الخاصة بعزل البروتوبلاست تربى القواقع اللازمة لها. إنزيم القواقع يباع تحت أسماء تجارية فى صورة سائلة بإسم Glusulase وفى صورة مسحوق بإسم Helicase.

زيادة نقاوة الإنزيمات التجارية المتخصصة تكون هامة فى زيادة كفاءة الفصل للبروتوبلاست. يتم عمل ذلك بإزالة الشوائب ذات الوزن الجزيئى المنخفض أى التنقية بواسطة طريقة تبادل الأيونات بإستخدام الراتنجات ion-exchange resins. ثم يتم عمل تجفيف تجميد freeze dried للإنزيم. ولكن فى بعض الحالات زيادة نقاوة الإنزيم تسبب نتيجة عكسية حيث تقلل من كفاءة فصل البروتوبلاست، ويبدو فى هذه الحالة أن مخلوط الإنزيمات السابقة يكون مطلوب لتقصير مدة الفصل وكفاءتها.

فصل البروتوبلاست بالإنزيمات يمكن عمله بطريقتين وهما sequential method و mixed-enzyme treatment. وسنشرح هاتين الطريقتين فى حالة عزل البروتوبلاست من الأوراق أو الخلايا المزروعة cultured cells، ولأن هاتين الحالتين هما الأكثر إستعمالاً فى حالة عزل البروتوبلاست. قبل معاملة الأوراق بالإنزيمات يجب تقيمها سطحياً بمحلول مناسب مثل كلوريد الزئبقيك (السليمانى) أو هيبوكلوريب الصوديوم أو فوق أكسيد الإيدروجين أو كلوروكس أو المحاليل المشابهة للكلوروكس وفى جميع الحالات تغسل بعد ذلك بالماء المعقم. وعند إستخدام الإنزيمات يجب أن تكون معقمة أيضاً ولأنها حساسة جداً لدرجة الحرارة المرتفعة فإنها تعقم بالترشيح.

فى حالة sequential method توجد خطوتين:

- يتم نزع بشرة الورقة ثم توضع الأوراث المنزوعة البشرة على هزاز shaker مثل ورق التبغ فى محلول إنزيم pectinase.

- أو تعامل الأوراق بطريقة أخرى وهى أن تسحق فى هون فى محلول منظم مناسب مثل أوراق الفول السودانى أو السيقان المتورقة فى نبات الأسبرجس.

وفى كلا الحالتين يتم الحصول على خلايا مفردة. بعد ذلك هذه الخلايا المفردة تحضن فى إنزيم السليليز لإزالة الجدار الخلوى.

البروتوبلاست التى تتحرر من الخلية تطفو على السطح وتجمع وتغسل جيداً لإزالة الإنزيم وبقايا الجدران. هذا البروتوبلاست يرسب فى القاع فى حالة إستخدام السربتول أو المانيتول كبيئة plasmolytica، وبعد ذلك فإنه يمكن فصل البروتوبلاست على هيئة راسب pellet عن الأجزاء الأخرى بواسطة طرد مركزى معتدل gentle وأن supernatant يحتوى على الإنزيم وبعض البقايا الدقيقة، يتم إستبعاد هذا الـ supernatant والبروتوبلاست الراسب فى القاع pelleted protoplasts يتم عمل معلق له مرة أخرى resupended فى محلول غسيل يحتوى سكروز ليكون بيئة plasmolyticum. ثم يتم عمل طرد مركزى معتدل مناسب فإن البروتوبلاست يطفو أعلى بينما بقايا الخلايا والأجزاء الغير مهضومة ترسب فى القاع. يتم إزالة البروتوبلاست بواسطة ماصة مناسبة Pasteur pipette ثم تغسل وذلك بإعادة عمل معلق منها resuspension ومع طرد مركزى معتدل مناسب فى محلول مانيتول أو محلول سكروز. وهكذا يكون البروتوبلاست معد للتجارب.

هذه الطريقة السابقة تكون مناسبة لبعض خلايا الميزوفيل لبعض الأوراق مثل التبغ ولكن فى حالات أخرى هز أجزاء الأوراق أثناء المعاملة بالبكتينيز يسبب إنفجار البروتوبلاست داخل الجدار الخلوى. ولذلك تم عمل تحوير لهذه الطريقة لتفادى هذه المشكلة. فإن الأوراق المنزوعة البشرة يتم تحضينها فى إنزيم البكتينيز دون هز statically incubated ثم بعد ذلك تحضن فى السيليليز دون هز أيضاً. ثم يتم تحرير البروتوبلاست بواسطة هز رقيق gentle agitation. يمكن فى هذه الحالة زيادة كفاءة إختراق الإنزيم للخلايا بإستخدام التفريغ vacuum infiltration. ولكن فى هذه الحالة الأخيرة بدون هز يكون عدد البروتوبلاست الناتج قليل.

أما الطريقة الثانية mixed-enzyme treatment فإنها طريقة من خطوة واحدة singlestep حيث يستخدم مخلوط من إنزيمات السيليلوليز والبكتينيز وحيث يحدث فصل الخلايا وتحلل الجدار الخلوى فى آن واحد. فإن الأوراق المنزوعة البشرة تحضن بدون هز مع تعريض الميزوفيل لملامسة سطح محلول الإنزيم. البروتوبلاست المتحرر يغسل بواسطة طرق الغسيل السابق ذكرها فى الطريقة السابقة.

جميع الحالات السابقة كانت عن كيفية عزل البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق. ولكن بعض الأوراق كما فى التبغ يمكن فصل خلايا البشرة للسطح العلوى والسطح السفلى ويمكن تحرير البروتوبلاست منها بإستخدام مخلوط من السيليوليز والبكتينيز. يمكن أن نحصل بهذه الطريقة على بروتوبلاست الميزوفيل وبروتوبلاست خلايا البشرة العليا مثلاً فى حالة إزالة سلخ البشرة السفلى. يمكن فصل بروتوبلاست الميزوفيل عن بروتوبلاست البشرة بواسطة إختلاف طفوهم وذلك بعد عمل الطرد المركزى لهم فى المانيتول أو السربتول فإن بروتوبلاست البشرة يكون لونه أخضر مصفر باهت ويكون طبقة فى الراشح بينما بروتوبلاست الميزوفيل لونه أخضر براق يرسب فى القاع. يلاحظ أن فى هذه الحالة إزالة سلخ البشرة السفلى أولاً. ولذلك بعد إتمام الطريقة السابقة فإن البقايا بعد الهضم التى تبقى على سطح الإنزيم تكون طبقة الكيوتيكل والخلايا الحارسة. حيث أن جدر الخلايا الحارسة تكون مقاومة للتحلل بالإنزيم.

أما بالنسبة لحالات عزل البروتوبلاست من الخلايا المنزرعة cultured cells تستخدم الطريقة الثانية أى مخلوط الإنزيمين. عامة الأنسجة الهشة من الخلايا المنزرعة تكون مفضلة لأنها تسهل إختراق الإنزيم. فى هذه الحالة للخلايا المنزرعة من الجزر وفول الصويا وبعض حالات من التدرن التاجى وأيضاً من نبات فيرجينيا الزاحف virginia creeper ينتج عنها كميات كبيرة من البروتوبلاست.

عامة فى جميع الحالات السابقة تقابل صعوبات ومشاكل أثناء العمل خاصة بكل حالة ويجب حلها وفيما يلى أمثلة لبعض منها وكيفية حلها.

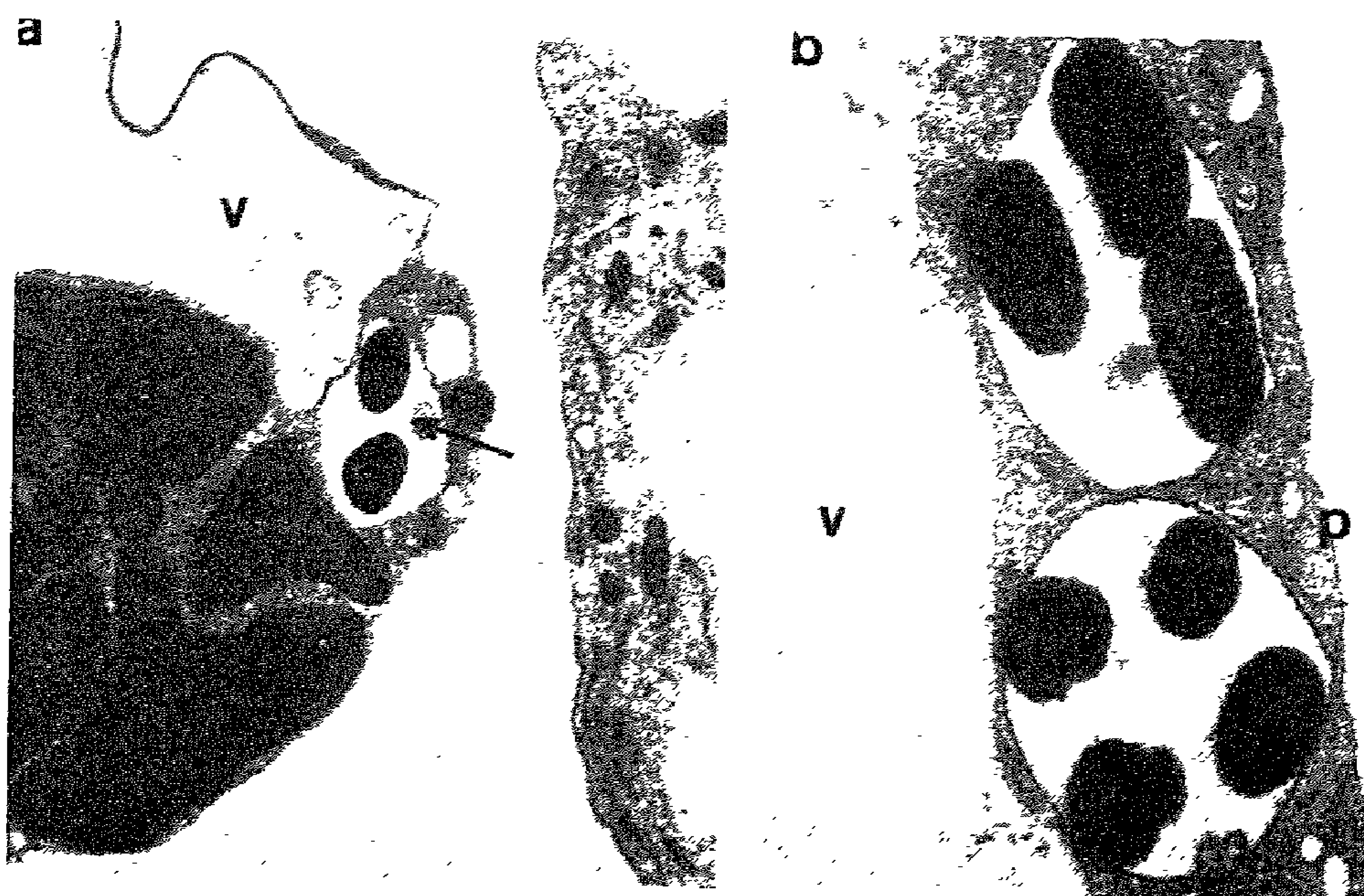
فمثلاً إزالة البشرة السفلى للأوراق لبعض نباتات ذات الفلقتين تكون سهلة مثل نبات التبغ واللوبيا وغيرها. وعلى العكس من ذلك فإن إزالة البشرة لأوراق ذوات الفلقة يكون صعب ولذلك فإن الأوراق يتم تجزئتها إلى قطع شريطية ضيقة قبل غمرها في الإنزيم. بعض الباحثين يضيف لمخلوط الإنزيمين إنزيم محلل للكيوتيكل كوتينيز cutinase لتفادى مشكلة إزالة البشرة تركيز الإنزيم هام حيث أنه متوقف على خواص النسيج وعلى عمر النسيج وعامة فإن تحرير البروتوبلاست يكون أسهل في الخلايا النشيطة النمو. يختلف تركيز الإنزيم بإختلاف نوع النسيج ونوع العضو النباتى وعمر النسيج ويمكن معرفة ذلك بالتجربة لكل حالة.

عامة نادراً ما يتحرر البروتوبلاست تماماً من الجدار الخلوى في حالة الخلايا المنزرعة cultured cells بإستخدام الإنزيمات المناسبة. يمكن تحرير البروتوبلاست في بعض الحالات بواسطة الطرد المركزى كما هو الحال في بروتوبلاست الميزوفيل.

في بعض الحالات الأخرى فصل وتحرير البروتوبلاست تماماً عن الجدار الخلوى يمثل مشكلة حيث أنهما يظلان ملتصقان أثناء التجربة وأثناء الغسيل كما أن طفوهما سيكون واحد، وفى هذه الحالة يتم غسيل الأجزاء المهضومة على نيلون nylon أو مرشحات صلب غير قابلة للصدأ لها أحجام ثقوب مناسبة للسماح بمرور البروتوبلاست المحرر تماماً وليست الخلايا الغير مهضومة أو المهضومة جزئياً. هذه الطريقة الأخيرة إستخدمت بدرجات مختلفة من النجاح لعزل البروتوبلاست المحرر أى العارى من الخلايا وهكذا يمكن الحصول على تحضيرات من البروتوبلاست نقية غير ملوثة بالخلايا.

من الخواص الهامة جداً للبروتوبلاست العارى أن البلازماليما عبارة عن غشاء يمكن أن يكون نتوءات للخارج كما أنه يمكنه تكوين تقعيرات للداخل invaginations. الدراسات بالمجهر الإلكترونى للبروتوبلاست العارى أثبتت حدوث تكوين كثير من الحوصلات في السيتوبلازم. وكل حوصلة محاطة بغشاء مفرد والتى تنشأ في كثير من الحالات من تقعير البلازماليما داخل السيتوبلازم حيث يزداد التقعير ثم يغلق

نتيجة لإلتحام البلازماليما وتصبح حوصلة بداخل السيتوبلازم. لو حدث تكوين هذه الحويصلات أثناء البلزمة فإنها تسمى plasmolytic cesicles ويكون بعضها كبير بدرجة كافية ليأخذ ويحتوى كائنات حية دقيقة. ثبت حدوث ذلك فى عمل بروتوبلاست عارى من خلايا العقد الجذرية فى اللوبيا فإنها تلتقيم البكتيريا *Rhizobium japonicum* والمسئولة عن تثبيت النيتروجين طبيعياً فى العقد الجذرية فى نبات اللوبيا. ويتم عمل ذلك بوضع عدد كبير من خلايا البكتيريا فى مخلوط الإنزيمين أثناء عزل بروتوبلاست ميزوفيل الأوراق ونتيحة ذلك نجد أن البكتيريا توجد فى داخل حوصلات فى السيتوبلازم وفى الشكل (شكل ١٠٧) توجد فى حوصلة خليتين بكتيريا وفى حوصلة ثلاثة خلايا وفى حوصلة أربعة خلايا.

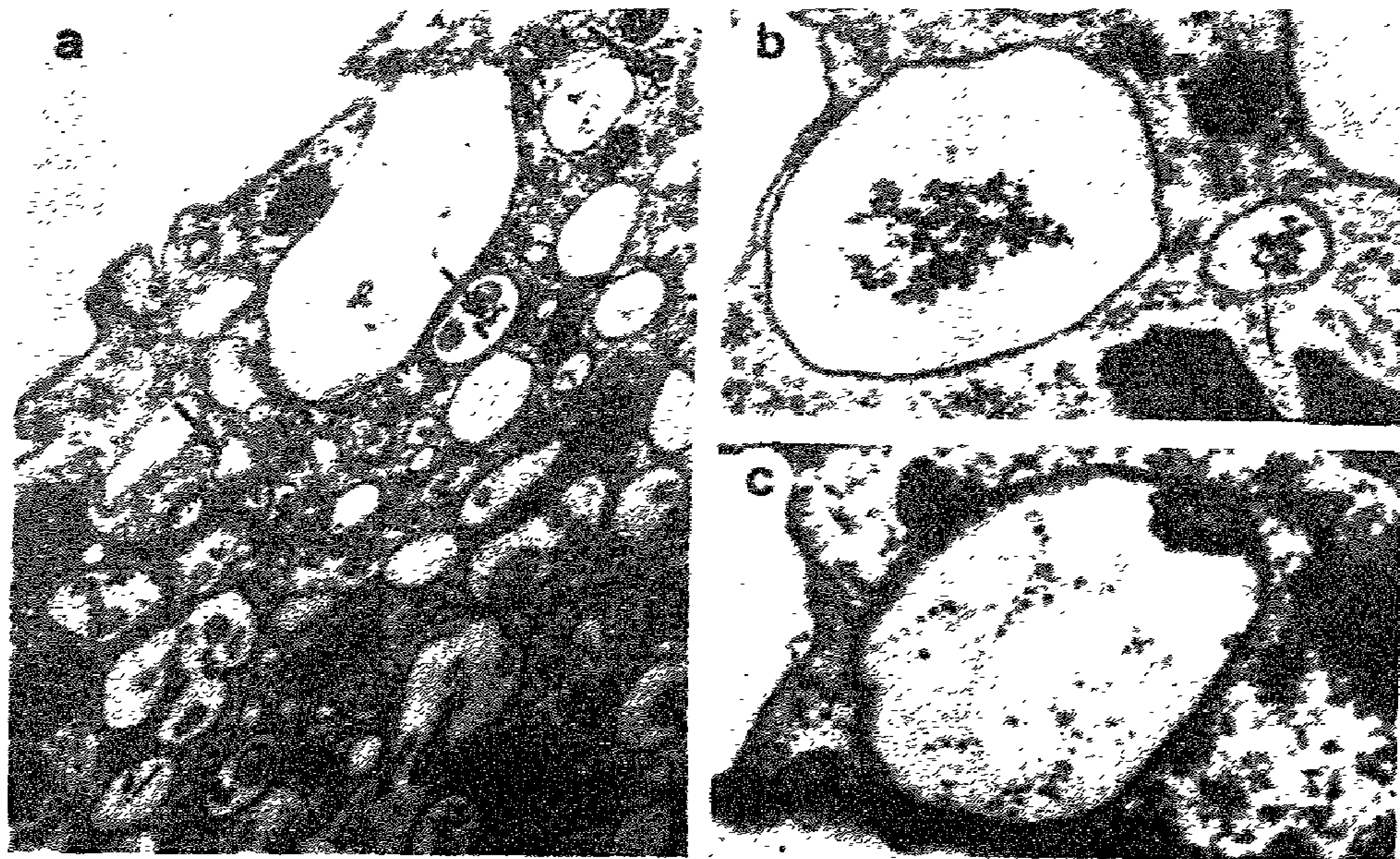


شكل ١٠٧: صورة بالجهر الإلكترونى لبروتوبلاست عارى من ميزوفيل اللوبيا، (a) حوصلة بها خليتين بكتيريتين من Rhizobium، (b) حوصلتين أحداهما بها ثلاثة خلايا بكتيرية والأخرى بها أربعة خلايا بكتيرية أ = بلازماليما، c = بلاستيدة خضراء، v = فجوة عصارية.

جدر الخلايا البكتيرية تكون مقاومة للإنزيمات التى تحلل جـدر خلايـا النباتـات العادية. عامة البكتيريا يمكن أن تصل للبلازماليما بعد إختراق جدار خلية النبات الذى تم تحليله جزئياً أو كلياً بالإنزيمات ثم بعد وصول البكتيريا للبلازماليما وأنه يحدث له تقعير للداخل ثم تتكون الحوصلات تحتوى البكتيريا. عامة إلتقـام البكتيريـا يحـدث بسهولة نسبياً نتيجة حركة البكتيريا أى سباحة البكتيريا.

يوجد نوع آخر من الحوصلات يتكون ويكون صـغير الحجـم عـن الحوصـلات السابقة ويسمى pinocytotic vesicles وينشأ هذا النوع من الحوصلات أثناء إزالـة الجدار الخلوى وفى البروتوبلاست الحر العارى. فى خلايا الحيـوان تعـرف حالـة pinocytosis بأنها دخول مواد إلى داخل الخلايا عن طريـق تقعيـرات البلازماليمـا للداخل. درجة حدوث ذلك فى خلايا النبات غير معروف ولكن من الدراسـات علـى البروتوبلاست الحر أمكن إثبات حدوث هذه الظاهرة. يبدو أن إزالة الجدار الخلـوى يشجع نشاط سطح البلازماليما. وحدوث هذه الحالة أى pinocytosis يعتمد على نوع البروتوبلاست تحت الدراسة وعلى محتويات وتركيب plasmolyticum.

تبدأ هذه الحالة بإدمصاص الجزيىء أو الجزء على سـطح البلازماليمـا ويوجـد شحنات على هذا الجزء المدمص يقابله شحنات على غشاء البلازماليمـا والعلاقـة بينهما تكون حرجة. مركبات عديدة الكاتيونات مثل poly-L-ornithine يمكنها تغيير شحنة البلازماليما وتستخدم أحياناً فى تركيزات منخفضة وهى ١ إلى ٢ ميكروجـرام لكل سم[٢] وذلك لتشجيع الإدمصاص والإلتقام. ولإثبـات عمليـة pinocytosis فـإن البروتوبلاست العارى يحضن فى plasmolyticum مناسب محتـوى علـى المـواد المطلوب إلتقامها لمدة عدة دقائق إلى عدة ساعات تبعاً لنوع البروتوبلاست والمـواد المراد إلتقامها. أمكن إثبات إلتقام كرويات صغيرة مـن راتـنج polystyrene latex-polystyrene قطرها حوالى ٠,٣ ميكرومتر وجزيئات ثانى أكسيد الثوريوم thorium dioxide وجزيئات عضوية كبيرة الحجم مثل الفيرتين ferritin والفيروسات بواسطة البروتوبلاست الحر العارى بواسطة المجهر الإلكترونى (شكل ١٠٨).



شكل ١٠٨: صورة بالجهر الإلكترونى توضح أخذ إلتقام جزيئات بواسطة حوصلات pinocytotic متكونة فى بروتوبلاست عارى من ميزوفيل نبات التبغ. (a) إلتقام جزيئات ثانى أوكسيد الثوريوم بواسطة حوصلات موجودة بالبروتوبلاست (مشار إليها بسهم) (x14000)، (b) تكبير لحوصلتين تحتويان أوكسد الثوريوم (x28000)، (c) جزيئات ferritin فى حوصلة pinocytotic ‏(x32000).

وهكذا فإن إلتقام مواد أو كائنات حية دقيقة فى السيتوبلازم بواسطة الحوصلات حقيقة واقعة فى البروتوبلاست الحر العارى. أمكن عمل هذه التجارب بواسطة العناصر المشعة الموجودة فى جزيئات كبيرة مثل الأحماض النووية ومنها دنا البكتيريا إ. كولاى وأيضاً رنا الفيرس TMV فيرس تبرقش التبغ وإلتقام الأجزاء السابقة بواسطة البروتوبلاست العارى للنباتات الزهرية. عامة غير معروف بالضبط آلية الدخول فى هذه الحالات دنا ورنا فقد تكون إختراق هذه الجزيئات مباشرة للبلازماليما أو أنها تدخل عن طريق الحوصلات ثم تصبح حرة وتتحرر فى السيتوبلازم. توجد أيضاً أبحاث حول إلتقام الأنوية المعزولة الحرة وأيضاً البلاستيدات الخضراء الحرة المعزولة بواسطة البروتوبلاست العارى للنباتات الزهرية ولكن آلية الإلتقام غير معروفة.

زراعة بروتوبلاست النباتات الورقية

The culture of higher plant protoplasts

توجد تجارب مبكرة لزراعة البروتوبلاست على بيئات سائلة أثناء عـام ١٩٧٠. حدث تقدم ملموس فى ذلك وتم عمله بواسطة Melchers، Labib، Takeba حيـث تمكنوا من زراعة بروتوبلاست حر من خلايا ميزوفيل نبات التبغ علـى بيئـة شـبه صلبة semi-salid بإستخدام ٠,٦% آجار. وهذه الطريقة أصبحت روتينية لزراعـة البروتوبلاست الحر من أنسجة عديدة، يتم عمل هذه الطريقة كما يلى:

- يتم عمل معلق من البروتوبلاست العارى فى بيئة سائلة مناسبة. يكون تركيـز البروتوبلاست الحر العارى فى المعلق ضعف التركيز المطلـوب فـى أطبـاق بترى.
- ثم يتم صب المعلق السابق فى أطباق بترى معقمة ثم يصب فى هذه الأطبـاق بعد ذلك كمية متساوية من البيئة التى تحتوى ١,٥% آجار على درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية وتضاف بسرعة وبرقة.
- يتم تحريك الطبق لتوزيع البروتوبلاستات العارية داخل الطبق بالتساوى.
- ثم تترك الأطباق بعد ذلك ثابتة لفترة لكى يتصلب الآجار.
- ثم توضع الأطباق فى الحضان فى الظلام ولكن بعض البروتوبلاسست يحتـاج إلى إضاءة خافتة وخاصة المأخوذة من ميزوفيل الأوراق. حيـث أن الإضـاءة الشديدة الزائدة تسـبب فسـاد البروتوبلاسـت protoplast collapse وفسـاد الكلوروفيل وإختفاء لونه. البيئة فى هذه الحالة لابد أن تحتوى مانيتول.

زراعة البروتوبلاست العار بهذه الطريقة يكون غير عميق ولكن لبضع ملليمترات لسهولة التهوية. أما البروتوبلاست العارى يمكن أن يحضن فى بيئة سائلة ثابتة دون هز فى أطباق بترى أو دوارق صغيرة أو حجرات صغيرة وفى حالة تكـون جـدران خلوية فإنه يمكن أن يهز برفق ويعامل على أنه معلق خلايا.

إن قدرة البروتوبلاست العارى على تكوين جدار خلوى جديد تكون كبيرة وهـذه

الحقيقة معروفة منذ عام ١٨٩٧ حيث تمكن Townsend من إثبات أن البروتوبلاست المبلزم للخلايا السليمة من نبات الألوديا ونبات زهــرة البطانيــة blanket flower (*Gaillardia lanceolate*) تكون جدار جديد آخر بداخل الجــدار الســابق. وأن ذلــك يحدث فى حالة وجود نواة بالخلية أى مرتبط مع وجود النواة.

بعض البروتوبلاست الحر تعيش لمدة ساعات فقط بعد العزل ولكن البعض الآخــر يعيش لعدة أيام أو أسابيع قبل الفساد والموت وعلى العكس مــن ذلــك فــى بعــض النباتات والتى يحدث فيها نشاط للتمثيل الحيوى بدرجة كبيرة أثناء العزل والتىتكون جدار بسرعة ويلى ذلك إنقسام سريع للخلايا وتكوين مستعمرات.

الأطوار الأولى لتخليق جدار جديد يجب دراستها وفحصها بالمجهر الإلكترونــى، وهذه الخطوات تحدث بسرعة وتبادأ حدوثها فى خلال بعــض ســاعات مــن نقــل البروتوبلاست المعزول إلى بيئة زراعة وتنمية، أمكن إثبات ذلــك لأول مــرة علــى بروتوبلاست حى معزول من أحد مساكن ثمرة الطماطم وقد تم عمل ذلــك بوســاطة Cocking ومساعدوه. وتحدث الخطوات فى الحالة الأخيرة وهى نفسها التى تحــدث قبل تخليق طبقة السيليلوز وهى عبارة عن تكــوين مكــون مــن عديــد الطبقــات multilamellar.

أوضحت الدراسات بعد ذلك أن الجدار الجديد يكون مشابه فــى تكوينــه للجــدار الإبتدائى فى الخلايا العادية. إتضح أن تتكون لويفات من السيليلوز على هيئة شــبكة تغطى البلازماليما العارى وذلك فى حوالى اليوم الثالث من الزراعة. لــوحظ تكــون حوصلات ربما تحتوى مواد جدار الخلية تشتق من سطح غشاء البلازماليــا وهــى تحتوى مواد غامقة electron-opaque material تنشأ من السيتوبلازم. تتخلل هــذه الحوصلات لويفات السليليوز وفى النهاية تختفى، يعتقد لأن محتوياتهــا تتحــد مــع الجدار أثناء تكوينه. بعد ٥–١٠ أيام من الزراعة فإن اللويفات تصبح متداخلة بكثافة ويظهر الجدار الجديد.

أحياناً يكون تكوين الجدار غير كامل، تكون النتيجة حدوث تبرعم للبروتوبلاست وبروزه من مناطق الضعف فى الجدار. يلاحظ بالمجهر الضوئى تغير البروتوبلاست من شكلها نتيجة للضغط وعادة تلتصق ببعضها. يلاحظ أيضاً حدوث تغيرات أيضاً فى داخل البروتوبلاست أثناء الخطوات الأولى المبكرة من تكوين الجدار. زيادة فى كمية السيتوبلازم مصحوبة بنشاط فى الحركة الإنسابية للسيتوبلازم. تتكاثر البلاستيدات والميتوكوندريا وتتجمع فى السيتوبلازم حول النواة. وتتحرك النواة لتتوسط الخلية. يلاحظ زيادة فى الريبوسومات والبولى سوم والشبكة الإندوبلازمية والتى تكون خشنة فى هذه المرحلة. تختفى الجرانا فى البلاستيدات الخضراء تدريجياً وحيث يعاد تشكلها إلى بلاستيدات النشا مختزنة النشا. وهذه التغيرات تحدث فى البروتوبلاست المنماه فى الظلام أو الضوء.

ليس من الضرورى أن يعقب تخليق الجدار إنقسام الخلية. وفى المزارع لابد أن يحدث تخليق لسيتوبلازم جديد. وفى هذه الأثناء إذا لم يحدث إستعادة النشاط الحيوى المركز regenerated cell فى هذه الفترة فإن الخلية المتكونة تفشل فى الإنقسام. أحياناً تكون البيئة اللازمة لإعادة تكوين الجدار غير ملائمة لإنقسام الخلايا المتكونة. وفى نفس الشئ فإن إستخدام بيئة تحتوى هورومونات نباتية لازمة لإنقسام الخلايا قد تكون غير مناسبة لإنتاج وإعادة تكوين الجدار لأن الهرمونات تؤثر مباشرة على البلازماليما العارية مسببة تمدد ثم إنفجار وموت البروتوبلاست المعزول. ولذلك فمن المناسب إستخدام بيئة مناسبة لإعادة تكوين الجدار ثم إستخدام بيئة أخرى ثانية مناسبة لإنقسام الخلايا. ولكن فى بعض الحالات يمكن أن يحدث تكوين الجدار وإنقسام الخلايا فى نفس البيئة.

عادة أول إنقسام للخلية ينتج عنه خليتين بنويتين متساويتين فى الحجم. يحدث إنقسام للخلية بتكوين جدار فاصل بين النوايتين المنقسمتين. وفى هذه الحالة فإن الجدار المتكون لأول إنقسام يمكن أن يتكون عبر الفجوة العصارية الكبيرة على هيئة لسان ممتد من السيتوبلازم عبر النواة a tongue-lie ingrowth of cytoplasm هذه

الطريقة معروفة لأنها تسمح للخلايا ذات الفجوات العصارية لأن تنقسم فى الخلايا المزروعة cultured cell يحدث بعد ذلك إنقسام للخلايا لتكوين مستعمرات من الخلايا والتى يمكن رؤيتها بالعين المجردة. الخلايا الناتجة من بروتوبلاست أخضر تكون بنية creamy-brown وذلك بعد ٣ أسابيع نمو فى الضوء. يمكن أن تتحول الخلايا تدريجياً إلى اللون الأخضر حيث أن البلاستيدات الخضراء تتشكل مرة أخرى. ولكن بالرغم من حدوث ذلك فإنها لا تصل إلى نفس مستوى التعقيد لأغشية الجرانا فى البلاستيدات الخضراء فى الخلايا العادية للورقة أى تكون مختلفة عن الخلايا العادية.

من الأهمية بمكان يجب عمل خفض تدريجى فى الضغط الأسموزى لبيئة الزراعة (لكى يحدث عكس البلزمة de-plasmolysis) وذلك ضرورى للحفاظ على سرعة الإنقسام القصوى للخلايا، وفى عدم حدوث ذلك يحدث للبروتوبلاست فى الخلايا المعاد تكوينها بلزمة ثانوية secondary plasmolysis وتبتعد بعيداً عن الجدار المتكون فى الخلايا المعاد تكوينها. يمكن عمل عكس البلزمة أى الشفاء من البلزمة وذلك بالتخفيف التدريجى فى plasmolyticum.

فى حالة بيئة الآجار، فإن مكعبات من البيئة المحتوية على بروتوبلاست منقسم يتم نقلها لسطح بيئة جديدة ذات نفس المكونات الغذائية ولكن لها ضغط أسموزى منخفض. عند ظهور مستعمرات الخلايا تهر على سطح بيئة الآجار فإنه يمكن الحفاظ على هذه المستعمرات على هيئة كالس بالنقل المستمر على البيئة regular transfer، فى حالة البيئة السائلة تعامل الخلايا الناتجة وكأنها معلق من الخلايا cell suspension culture.

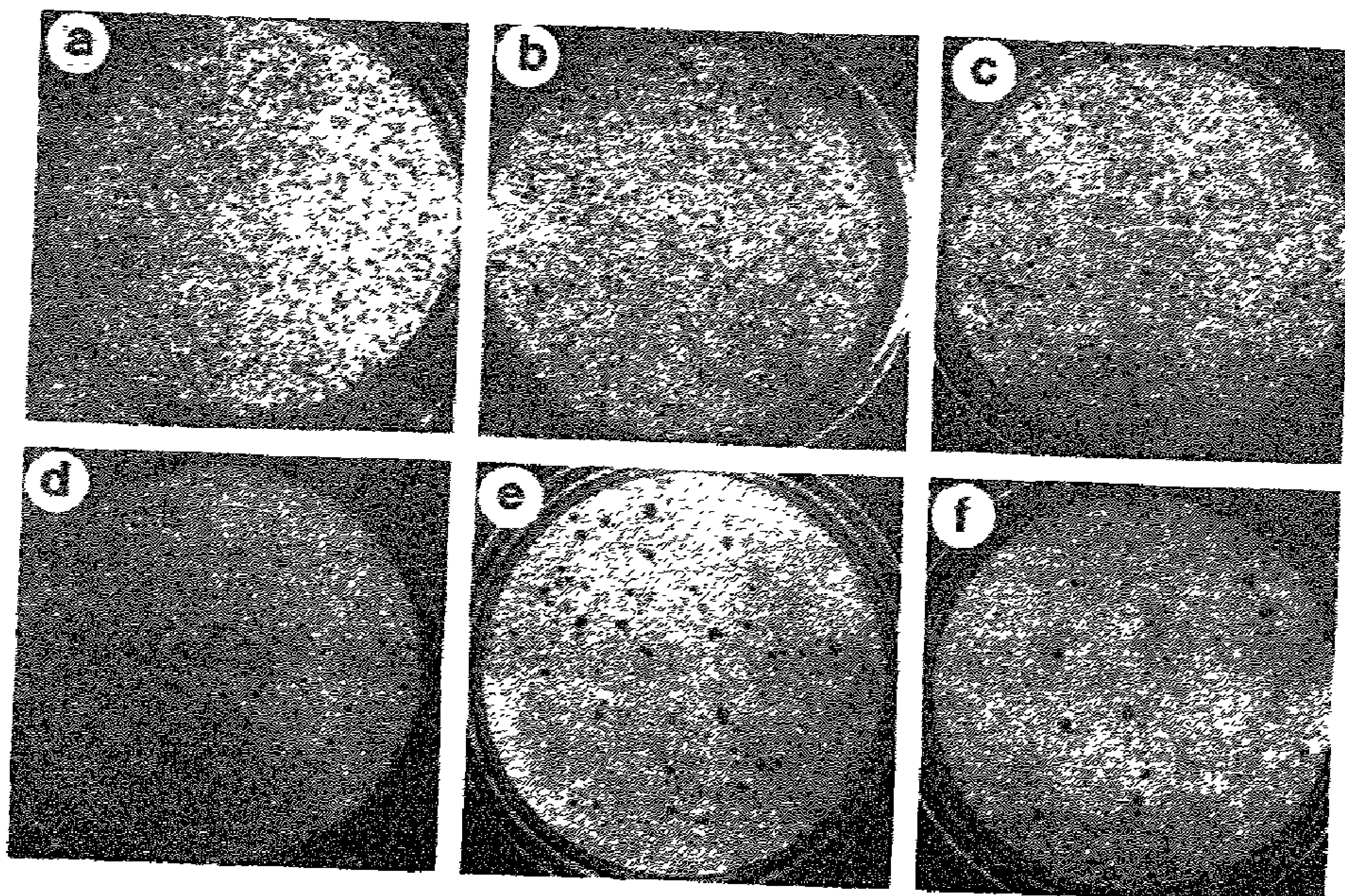
حفظ الخلايا الناتجة من مزارع البروتوبلاست يكون فى بيئة عادية ليس لها ضغط أسموزى.

فى حالة زراعة البروتوبلاست فإنه من المهم أن يكون لدينا تقدير أو فكرة عن كمية البروتوبلاست أى عددها الذى يمكن أن يكون مستعمرة. هذا ما يعرف بالإصلاح

الكفاءة الطبقية plating efficiency أى عدد البروتوبلاست التى تنمو فى طبق بترى من مجموع عددد البروتوبلاست الموجودة وتحسب كنسبة مئوية. فى حالة بروتوبلاست ميزوفيل أوارق التبغ تكون النسبة مرتبعة أى الكفاءة الطبقية مرتفعة وهى ٦٠% ولكن فى نباتات أخرى تكون منخفضة أقل من ٥% عادة.

وعامة لكى يحدث نمو للخلايا فإن البروتوبلاست العارى فى أغلب النباتات يجب أن يزرع بتركيز مرتفع plated at high density ويكون مرتفع عن ١٠٤ بروتوبلاست لكل سم٣. ولكن من عيوب هذه الطريقة أن المستعمرات الناتجة تتحدد فى الأطوار المبكرة جداً وبذلك يصعب تحديد عدد الخلايا النامية أو المستعمرة الناتجة من خلية واحدة. عامة يمكن التغلب على ذلك بعمل أقل عدد ممكن من البروتوبلاست ويمكن أن يحدث نمو، وذلك بإستخدام طريقة الخلايا الممرضة (من التمريض) nurse tissue أو الخلايا المربية حيث توضع هذه الخلايا الممرضة فى البيئة المشروطة conditioned memium مع وجود الآجار. وهذه الطريقة قام بعملها كل من Galun، Hunerman، Raveh بإستخدام خلايا ممرضة لتنشط إنقسام البروتوبلاست أو الخلايا فى كثافة منخفضة أى تركيز منخفض.

وقد وجد هؤلاء العلماء أن معاملة البروتوبلاست بأشعة X-irradiated X فإنها تفشل فى الإنقسام على بيئة الآجار بعد المعاملة ولكنها تعمل كخلايا ممرضة nurse cells وأيضاً تسمى خلايا مغذية feeder cells وأنها تنشط نمو البروتوبلاست الحى. يوضع البروتوبلاست المغذى أى الممرض أى المربى أسفل البروتوبلاست الحى فى الآجار أو يخلط معه. فى بعض تجاربهم إستخدموا بروتوبلاست ميزوفيل الورقة فى التبغ ثنائية diploid وعرضوها لأشعة X وإستخدمت هذه البروتوبلاست بتركيز مرتفع كطبقة مغذية feeder layer أسفل بروتوبلاست خلايا ميزوفيل الورقة الثنائية أو الأحادية. هذا البروتوبلاست المغذى شجع تكوين المستعمرات فى حالة البروتوبلاست الثنائى فى كثافة منخفضة نسبياً ١٠٣ بروتوبلاست لكل سم٣ وفى حالة البروتوبلاست الأحادى كانت أقل كثافة وهى ١٠٢ بروتوبلاستات لكل سم٣ (شكل ١٠٩).



شكل ١٠٩: ترجبة توضح أهمية البروتوبلاست الممرض أو المربى أو المغذى. تنشيط تكوين المستعمرات بإستخدام كثافة منخفضة **low density** من بروتوبلاست عارى أحادى من ميزوفيل أوراق التبغ وذلك بواسطة البروتوبلاست المغذى. (a) مقارنة – زارعة بروتوبلاست بتركيز مرتفع ٥×١٠^{٤} بروتوبلاست لكل سم^{٣}. وبدون وجود بروتوبلاست مغذى. (f,e,d,c,b) بروتوبلاست عارى زرع بتركيزات على التوالى وهى $١٠^{٤}$، ٥×١٠^{٣}، ٥×١٠^{٢}، $١٠^{٢}$ لكل سم^{٣} على بيئة تحتوى طبقة من البروتوبلاست المغذى تركيزها ٣×١٠^{٤} لكل سم^{٣} ومعاملة بأشعة X.

الحقيقة قليل نسبياً من مزارع البروتوبلاست تعطى نبات كامل. حيث أن مزارع البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق تنمو وتكون كالس ومن مزارع الكالس هذه يتكون منها مجموع خضرى ثم يتكون منه نبات كامل، ولكى يحدث ذلك بكفاءة فى قليل من النباتات مثل التبغ والبيتونيا *Petunia*، السلجم **rape** (***Brassica napus***).

يمكن عمل ذلك أيضاً من بروتوبلاست خلايا البشرة لنبات التبغ ومن السوق المتورقة **caladodes** للأسبرجس وأيضاً من بروتوبلاست خلايا منزرعة للجزر **cultured carrot cells**. حيث أن الكالس المتكون من البروتوبلاست ينقل إلى بيئة مناسبة لكى يحدث **morphogenesis** أى تكوين الساق. هذه السيقان المتكونة يتم تنشيطها لتكوين جذور عرضية ثم تنقل هذه النباتات الصغيرة إلى أصارى تحتوى

سماد معين أو بيئة سمادية معينة potting compost وهكذا تنمو حتى تكوين الأزهار. فى حالة نبات التبغ تحتاج الفترة من عزل البروتوبلاست إلى مرحلة الإزهار حوالى ١٠٠ إلى ١٢٠ يوم. وهكذا يمكن من نسيج كالس ناتج من بروتوبلاست واحد أن يكون عديد من السيقان وهكذا فإن عديد من النباتات يمكن أن ينتج من بروتوبلاست من عارى واحد.

الشكل الظاهرى للبروتوبلاست Protoplast morphology:

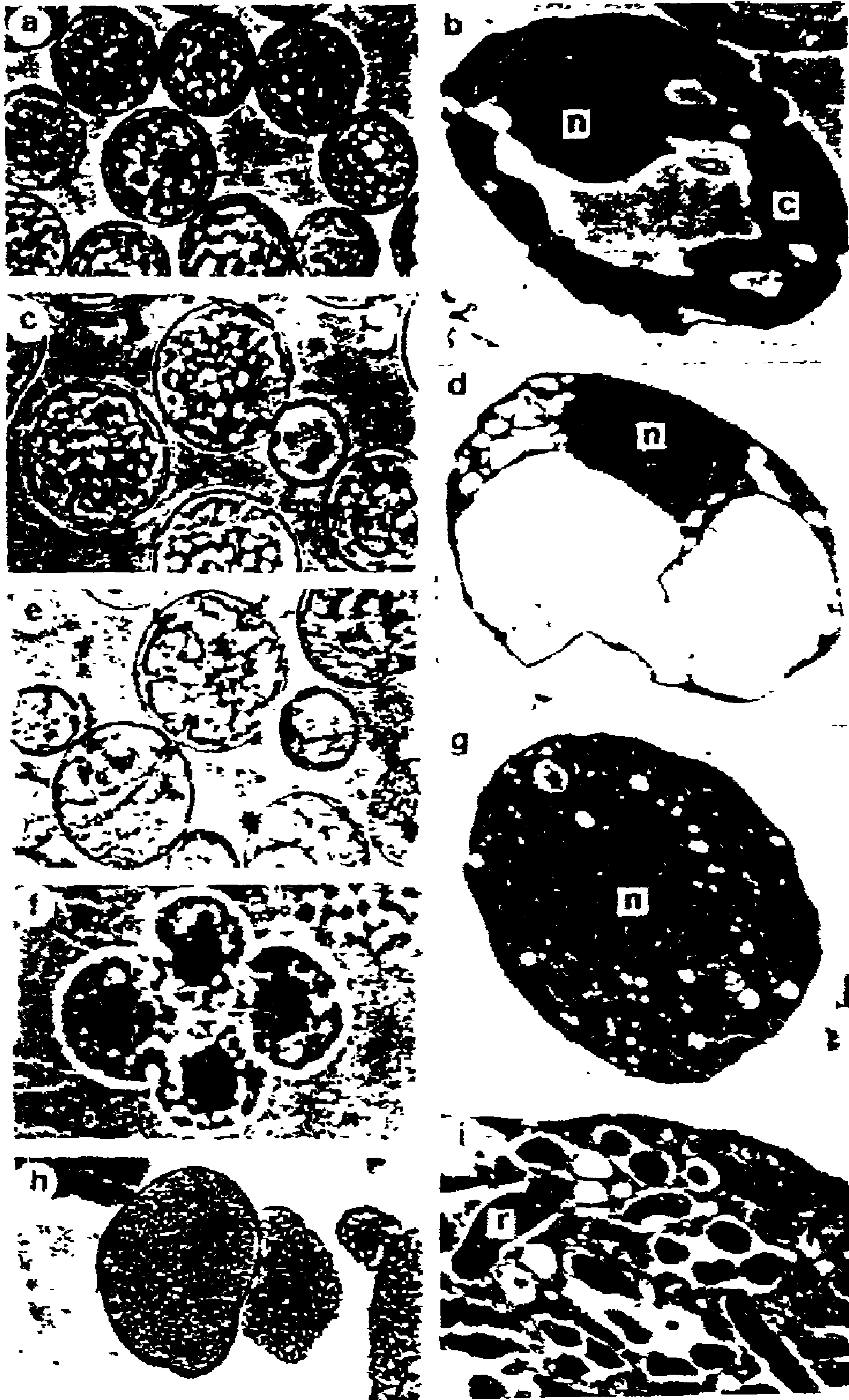
البروتوبلاست المعزول يتأثر بسرعة بالضغط الأسموزى للبيئة المحيطة plasmolyticum عند خفض الضغط الأسموزى بسرعة فإن البروتوبلاست يتمدد وينفجر أو يتمزق البلازماليما وينكمش ويفسد البروتوبلاست collapse. يعقب ذلك عادة طرد الفجوة العصارية والبلاستيدات الخضراء. العكس صحيح فى حالة زيادة الضغط الأسموزى فى بيئة الضغط الأسموزى plasmolyticum فإن البروتوبلاست ينكمش، وقد يسبب ذلك ضرر للبروتوبلاست وجفاف وقد يسبب بروز البلاستيدات الخضراء من البلازماليما. ولكن البروتوبلاست يمكن أن يتحمل التغيير التدريجى للضغط الأسموزى.

يختلف حجم ومظهر البروتوبلاست العارى تبعاً لمصدره من الخلايا الأم. فإن البروتوبلاست من الأنسجة غير المتماثلة يكون مختلف فى شكله الظاهرى وذلك بالنسبة لذوات الفلقة وذوات الفلقتين (شكل ١١٠). فى حالة بروتوبلاست المتحرر من خلايا ميزوفيل الورقة يكون له فجوة عصارية مركزية كبيرة مع توزيع البلاستيدات الخضراء على محيط السيتوبلازم؟ البروتوبلاست المتحرر من بشرة الورقة يمكن تمييزه عن خلايا الميزوفيل بلونه الأخضر المصفر الباهت وقليل من البلاستيدات وعديد من الأشرطة السيتوبلازمية. بروتوبلاست البتلات يكون ملون بلون الصبغات الموجودة فى الفجوة. البروتوبلاست من الخلايا المنزرعة culatured cells يكون لونه كريمى creamy-coloured وإذا وجد نشا يكون highly

refractive. بروتوبلاست الخلايا ذات الفجوات العصارية يكون قطرها حوالى ٢٥ إلى ٦٠ ميكرومتر، وفى حالة الخلايا المرستيمية والخلايا الأمية لحبوب اللقاح ورباعى حبوب اللقاح تكون أصغر قطرها ١٢-٢٠ ميكرومتر. العكس صحيح فى حالة بروتوبلاست الخلايا المصابة من العقد الجذرية يكون القطر ٢٠٠ ميكرومتر أو أكبر. بعكس جميع أنواع البروتوبلاست التى تكون عادة كروية فإن البروتوبلاست العارى للخلايا المصابة فى العقد الجذرية يكون متطاول بعد إزالة الجدار الخلوى وحيث أن شكلها يتحدد بعدد وتوزيع خلايا البكتيريا bacteroids فى السيتوبلازم.

الشكل الظاهرى للبروتوبلاست Protoplast morphology:

يحدث تزاوج بين بروتوبلاست النباتات المتقاربة وراثياً. حيث أن البروتوبلاست المعزول يمكن أن يتزاوج طبيعياً فى وجود مركبات تساعد على ذلك مثل بولى إيثلين جليكول ويسمى فيوزاجين fusagen. عند حدوث تزاوج بين البروتوبلاست فيحدث تزاوج سيتوبلازمى ونووى فتسمى الخلية فى هذه الخلية هجين hybrid cell حيث توجد نواه واحدة فى البروتوبلاست المتزاوج وقد يحث تزاوج سيتوبلازمى دون تزاوج نووى ويسمى البروتوبلاست الناتج فى هذه الحالة cybrid cell. يحدث عادة عقم للبروتوبلاست المتزاوج وقد ينتج عنه كالس ولا ينتج منه نباتات إطلاقاً. بعد حدوث تزاوج للبروتوبلاست يحدث له إنقسام وأثناء الإنقسام يحدث حالة تلكؤ lagging للكروموسوم أو أكثر ونتيجة لذلك فإن البروتوبلاست المنقسم ينتج عنه خلايا ناقصة كروموسوم أو أكثر وخلايا أرى زائدة كروموسوم أو أكثر ولذلك تنتج صفات جديدة نتيجة لوجود هذه الخلايا. يفيد تزاوج البروتوبلاست بين بروتوبلاستين أحاديين من نفس النوع أو الصنف كلا منهما عال المقاومة لمرض معين حيث ينتج عن ذلك بروتوبلاست ثنائى ينتج منه نبات ثنائى diploid شديد المقاومة للمرض.



شكل ١١٠ : أنواع البروتوبلاست العارى بالجهر الضوئى والجهر الإلكترونى (a-b) من خلايا ميزوفيل التبغ (X450, X2500)، (e) من cultured cell من الجزر (X450)، (f, g) رباعى حبوب اللقاح لنبات التبغ (X1650, X7500)، (h,i) خلايا مصابة فى العقد الجذرية لنبات فول الصويا (X220, X9000)، bacteroid خلايا البكتيريا = r، نواة = n بلاستيدة خضراء = c.

ويمكن أيضاً نقل صفات أخرى كثيرة خلاف المقاومة لأمراض النبات. وفى الشكل (شكل ١١٤و) ويوجد تزاوج بين بروتوبلاستين أحاديين من ورقتين أحاديتين مختلفتين وينتج من التزاوج خلية ثم تنقسم لتكون كتلة من الخلايا وهذه الكتلة تأخذ الشكل القلبى ثم الشكل الطوربيدى ومن هذا الشكل الطوربيدى (شبه الجنين embryoid) تتكون الباردة plantlet أو النبات الصغير ثم النبات الكامل. وبعد تزاوج البروتوبلاست توضع على بيئات مختلفة مناسبة وعلى هذه البيئات تحدث المراحل السابق ذكرها من تزاوج البروتوبلاست حتى النبات الصغير وبعد ذلك يزرع هذا النبات الصغير على بيئة مناسبة لإنتاج النبات الكامل.

خواص الإختراق والنفاذية لخلايا الثدييات ومنها الإنسان

Membranes and permeability of mammalian Cells

تخترق أى تنفذ النيوكليوتيدات إلى داخل الخلية ببطء شديد فى غالبية الخلايا أما عن النيوكليوسيدات والقواعد النووية فإنها تخترق خلايا الثدييات بطريقة تسمى facilitated transport. ومميزات هذه الإنتقال أن هذه المركبات تخترق الغشاء الخارجى للخلية أى تنفذ خلاله بواسطة بروتين ناقل a transport protein غير مرتبط إطلاقاً بالنشاط الطاقى للخلية metabolic energy ولذلك عادة فإن هذا البروتين لا يحدث له تثبيط بواسطة المثبطات metabolic inhibitors.

وحيث أن هذا النوع من الإختراق غير مرتبط إطلاقاً بالطاقة (يختلف تماماً عن ألنقل النشط المعروف أنه يحتاج طاقة أى يحتاج ATP) فإن هذه المركبات لا تنتقل عكس منحدرات التركيز (فى النقل النشط تنتقل المركبات عكس منحدرات التركيز). والنتيجة النهائية لهذا الإنتقال facilitated فإنه يعمل على تساوى تركيز المركبات الداخلى إلى داخل الخلية والسيتوبلازم مع تركيزها ىف خارج الخلية. أما آلية حدوث النقل المسهل facilitated على المستوى الجزيىء فهى غير معروفة بالضبط. ولكن يعتقد أن البروتين يكون tetramer (راجع شرح البروتين فى هذا الكتاب)

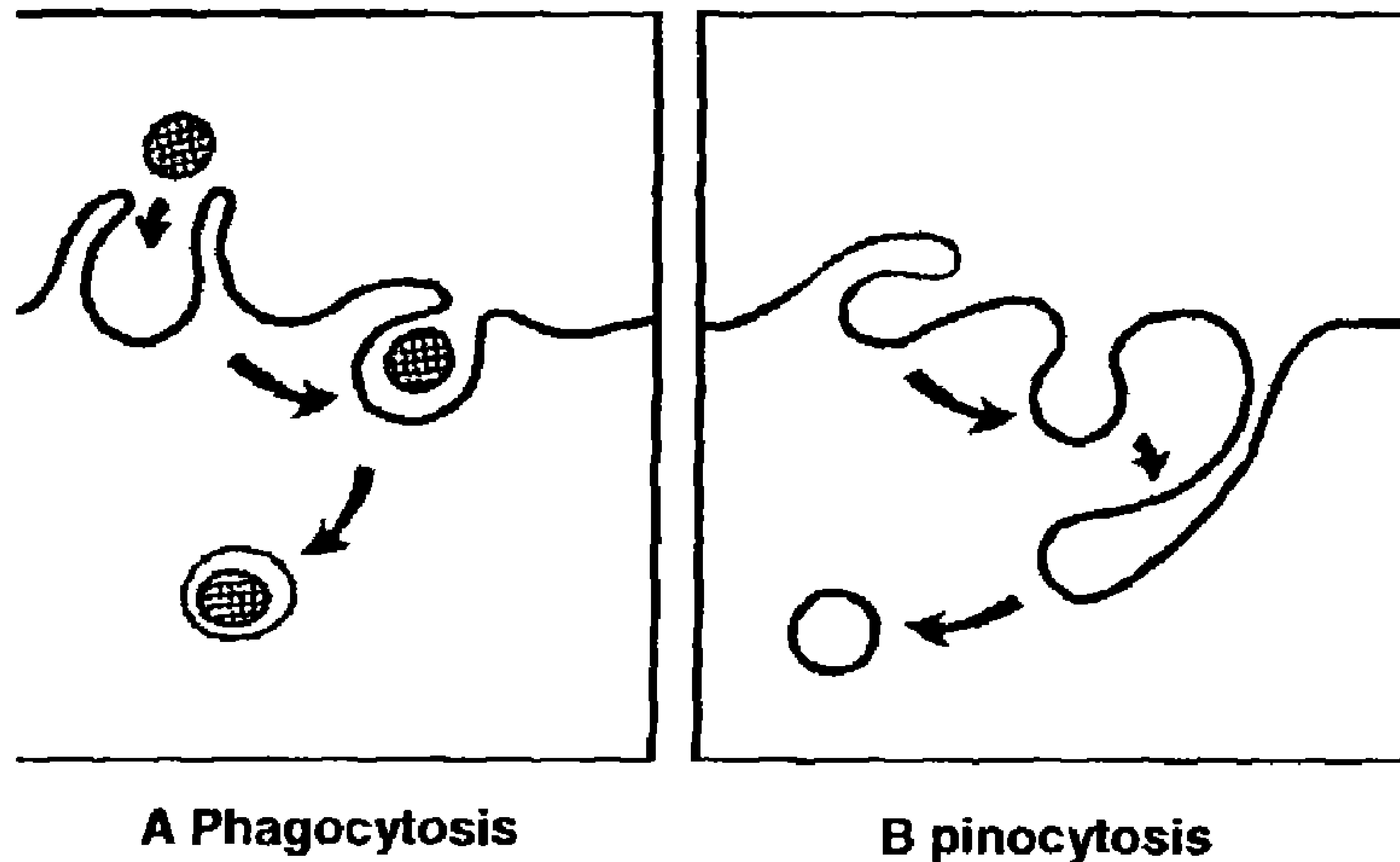
ويخترق أى يتخلل الغشاء البلازمى تماماً وهكذا يكون وصلة بين داخل وخارج الخلية. وتوجد به قناة وسطيه وهذا البروتين يلتحم بالمادة النووية ويغير نسبياً من شكلها وتركيبها ليسهل إختراق هذه المادة للقناة الوسيطه وهكذا تخترق الغشاء من الخراج إلى الداخل وتصبح موجودة بداخل الخلية عن طريق إختراقها للقناة الوسطية. وقد وجد أن هذا النقل المسهل له تجاذب للنيوكليوسيدات البيورينية purine nucleosides أكثر من النيكليوسيدات البيريميدنية pyrimidine nucleosides. وجد أن نيوكليوسيدات السيتوسين لها جاذبية منخفضة جداً لهذا النوع من النقل.

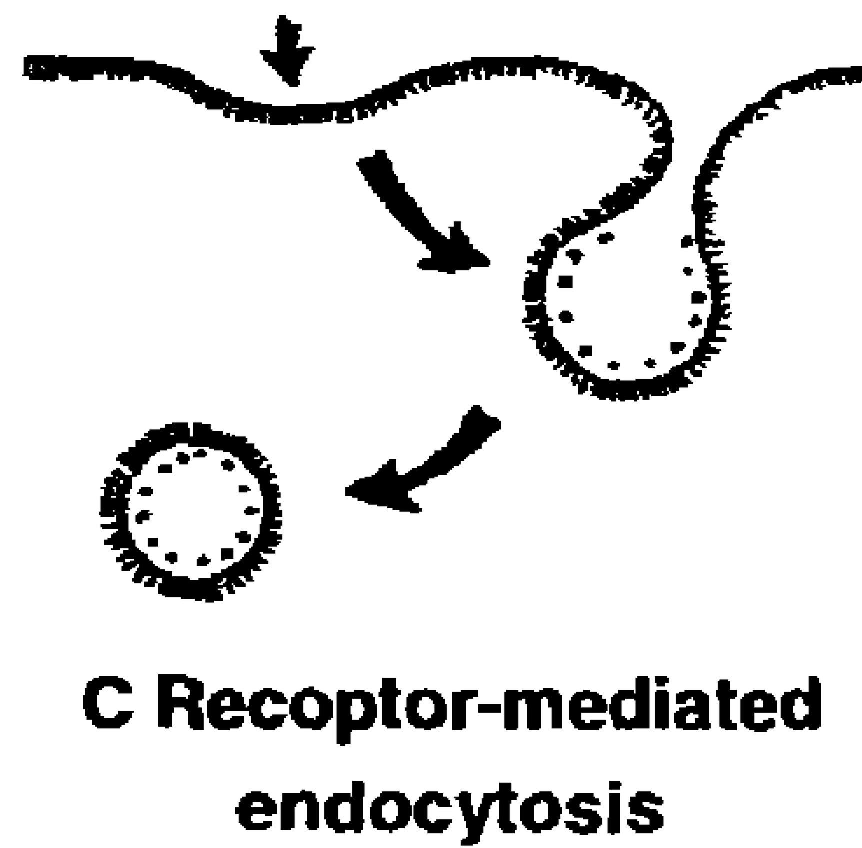
أما حالة النقل المسهل للقواعد النووية فهى أقل وضوح وتمييز. عامة البيورينات تنقل أسرع أى تنفذ أسرع عن البيريميدينات. والسيتوسين أفقر القواعد فى الإختراق أى أبطئها نفاذية، ويعتقد أن نفاذيته لا يتدخل فيها البروتين الناقل إطلاقاً، يمكن أن يحدث الإختراق فى الخلايا الحيوانية عبر الغشاء وليست خلاله transport across, but not through, membranes وهذه الطريقة تحدث بواسطة ما يسمى endocytosis أى نفاذية المواد إلى داخل الخلية دون المرور خلال الغشاء وذلك بإلتقام المواد والسوائل بطريقة أميبية وتكون حويصلات داخل السيتوبلازم (شكل ١١١).

ويوجد منها ثلاثة أنواع phagocytosis، pinocytosis. الأولى phagocytosis وهى إلتقام ودخول المواد الصلبة أو الشبه صلبة أو الغير سائلة أما الثانية pinocytosis فهى إرتشاف ودخول السوائل والمحاليل. والحالة الثالثة receptor mediated endocytosis وهى تحدث فى أماكن من الغشاء البلازمى خاصة حيث أنها تتميز بأنها مغطاة بهدبيات دقيقة bristles.

وهذه الهدبيات تتكون أساساً من بروتين يسمى كلاثرين clathrin. هذه المناطق المغطاة بهذه الهدبيات تسمى النقر المغلفة coated pits ويتكون منها حويصلات تسمى حويصلات مغلفة coated vesicles. وفى حالة إلتقام بروتين بواسطة هذه الحوصلات فإن هذا البروتين يتم التعرف عليه وإلتصاقه بواسطة مستقبل غشائى

متخصص يتكون من البروتينات specific membrane receptor proteins فى النقر المغلفة. هذه الحالة receptor mediated endocytosis تحتاج إلى طاقة ولذلك فإنها active process. ومما هو جدير بالذكر أن receptor mediated endocytosis يمكن أن تحدث فى مناطق من الغشاء البلازمى لا تحتوى نقر مغلفة.



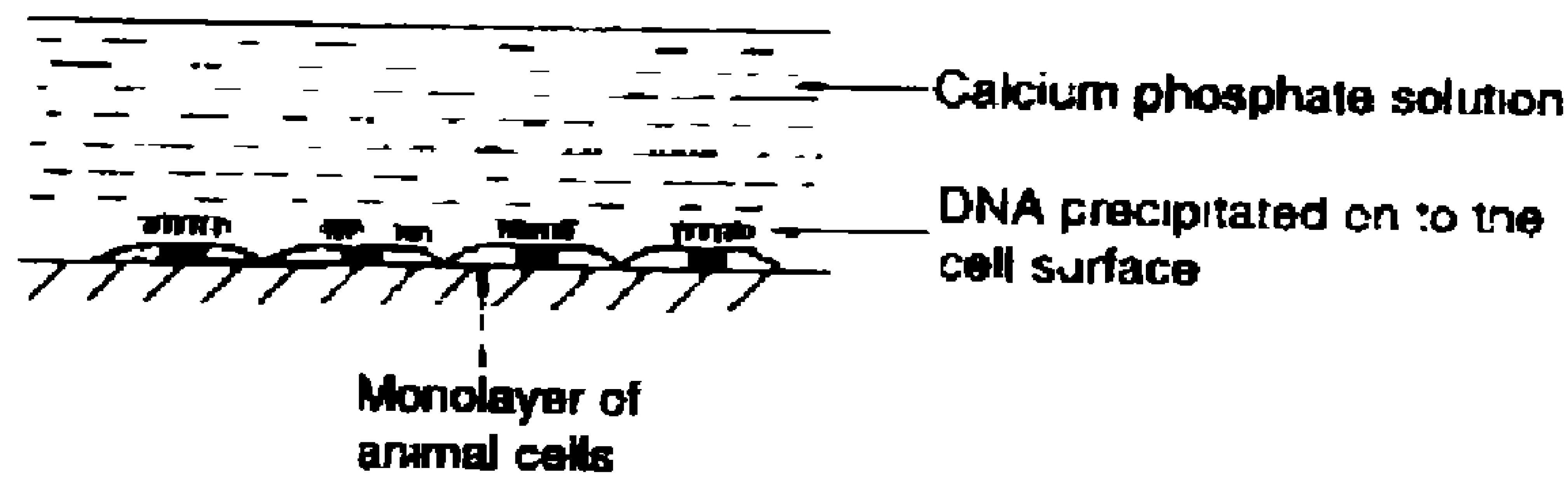


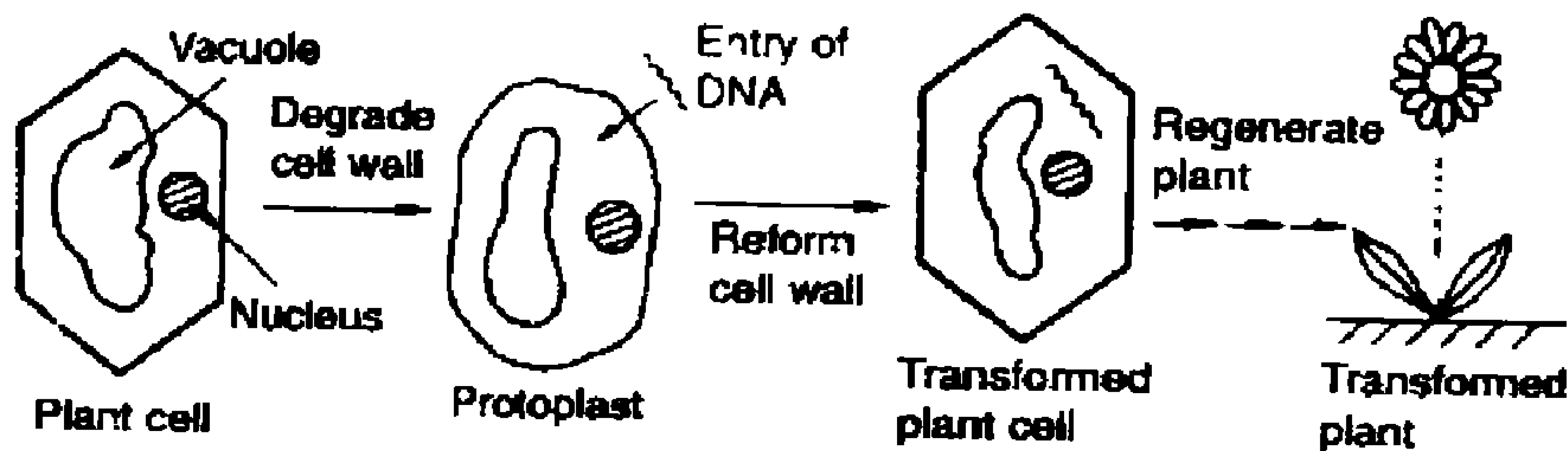
شكل ١١١: الحالات الثلاثة من endocytosis.

معاملة البروتوبلاست العارى فى النبات والفطريات والخميرة والطحالب:

وهكذا بعد الحصول على البروتوبلاست العارى كما سبق شرحه. فإن هذا البروتوبلاست يأخذ دنا ورنا بسهولة ولكن يمكن تنشيط التحول بطرق خاصة مثل الإنفاذ أو التثقيب الكهربائى electroporation حيث يتم تعريض الخلية لصدمات كهربائية قصيرة الزمن تسبب تغيير فى سعة الثقوب فى غشاء البلازماليما وخلالها

تمر جزيئات دنا ورنا، ويلاحظ أن هذه التغيرات فى تركيب الغشاء وقتية ثـم يعـود لطبيعته. بعد التحول يغسل البروتوبلاست لإزالة بقايا الإنزيمات المحللة ثم بعد ذلـك تتكون جدر للخلايا مرة أخرى. ومن هذه الخلية يتم تكوين النبـات الكامـل (شـكل ١١٢) كما سبق شرحه.



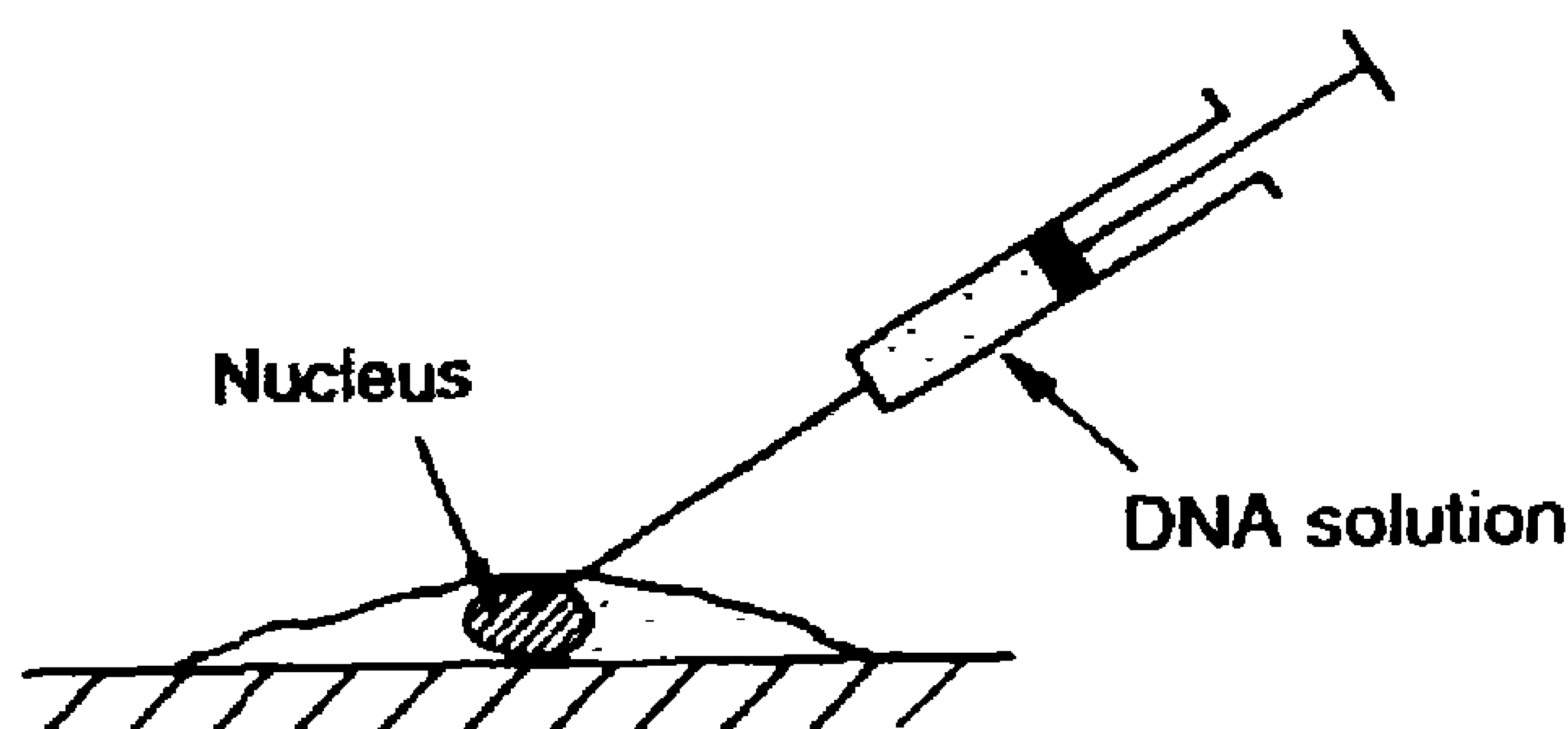


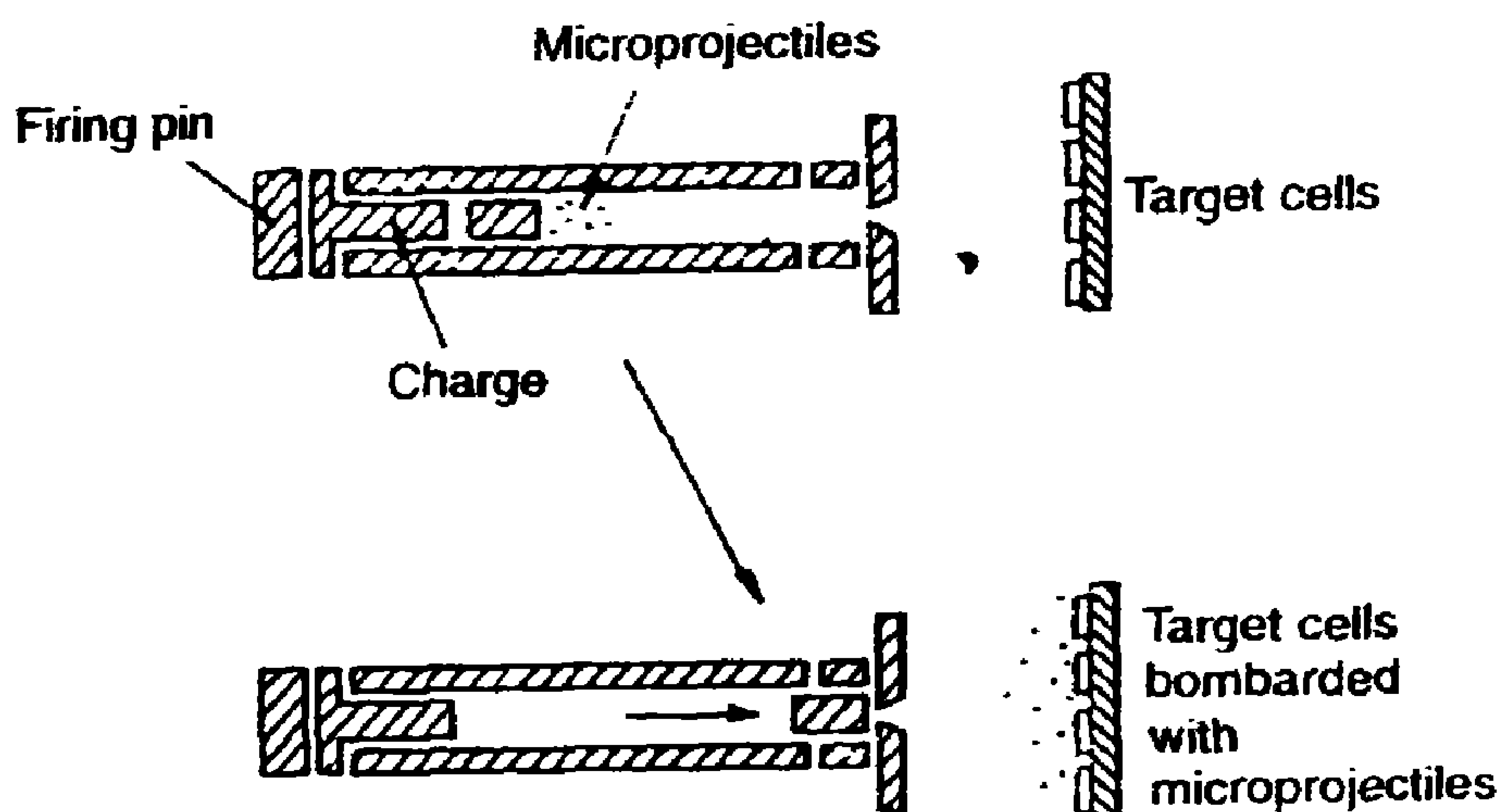
شكل ١١٢: بعض طرق إدخال دنا غلى داخل خلايا الحيوان أو النبات، (a) ترسيب فوسفات الكالسيوم على سطح خلية حيوان، (b) تحويل خلية نبات إزالة الجدار الخلوى – ثم تكوين الجدار مرة أخرى ثم تكوين النبات الكامل.

طرق أخرى غير الطرق الطبيعية تستخدم فى إدخال دنا للخلايا :

توجد طرق أخرى غير الطرق الطبيعية السابق شرحها. فى الطريقة الأولى، هـى الحقن بواسطة حقنة صغيرة (شكل ١١٣، ١١٤) **microinjection**. ويسـتخدم فـى ذلك ماصة دقيقة جداً لحقن جزيئات دنا مباشرة فى نواة الخلية (شـكل ١١٣). تـم تطبيق ذلك فى خلايا الحيوان ثم تم تطبيقه على خلايا النبات. أما الطريقة الثانية فهى قذف ضرب الخلايا بواسطة مقذوفات صغيرة **microprojectiles** عادة عبـارة عـن

جزيئات ذهب أو تنجستن مغلفة بجزيئات دنا. يتم قذف هذه المقذوفات مـن بندقيـة قذف جزيئات particle gun (شكل ١١٣) وتسمى هذه الطريقة biolistics. وتستخدم هذه الطريقة بكثرة ومن أمثل ذلك أجزاء من نبات الذرة من الأوراق حيث يمكـن أن يعامل بهذه الطريقة وتعى نتائج هائلة فى أوراق نبات الـذرة وغيرهـا كثيـر مـن النباتات.





شكل ١١٣: طريقتين فيزيائيتين لإدخال دنا داخل خليـة الحيـوان أو النبـات همـا microprojection and biolistics.



شكل ١١٦: إدخال دنا داخل خلية بشرة نبات (محب للملوحة halophyte بواسطة micro injection (منظر طبيعي مكبر جدا).

ويمكن إدخال جزيئات معاد صياغتها الجزيء DNA في الخلايا الحيوانية والإنسان بطرق عديدة وفي إحدى الطرق .. يتم ترسيب جزيئات DNA الأخيرة بفوسفات الكالسيوم الذى تلتقطه الخلايا الحيوانية، ويصبح جزء صغير من DNA الوارد مدمجاً بصورة ثابتة مع DNA الكروموسومي. وتعد كفاءة الإندماج منخفضة، ولكن الطريقة تعد مفيدة، لأنها سهلة التطبيق، وفي طريقة أخرى تحدث بكثرة في خلايا الحيوان والإنسان وبنجاح كبير وذلك بحقن DNA داخل الخلايا، وتستخدم ماصة زجاجية صغيرة ذات طرف دقيق (قطرها ٠,١ ميكرومتر). محتوية على

محلول من دنا معاد صياغته، يحقن داخل النواة فى بويضـــة فـــأر مخصــبة (شــكل ١١٤أ) ويستطيع باحث ماهر أن يحقن مئات الخلايا خلال ساعة من الزمن وتكــون حوالى ٢% من خلايا الفئران المحقونة حية. وتحتوى على مــورث جديــد (شــكل ١١٦ب) من دنا المعاد صياغته. دنا المعاد صياغته يحتوى علـــى جـــين أو جينـــات خاصة بهرمون النمو.

إستخدام الفيروسات دون الفاج فى نقل المورثات إلى خلايا الحيوان والنبات:

يمكن إستخدام الفيروسات لإدخال مورثات جديدة داخل الخلايا الحيوانيـــة، وتعـــد الفيروسات retroviruses (فيروسات RNA المحدثة للورم) أكثر الوسيطات الناقلـــة المؤثرة.

يمكن أيضاً إستخدام الفيروسات التى تصيب النبات لنقل المادة الوراثية كما يلـــى: يمكن أيضاً أن تستخدم هذه الطريقة فى دراسات على مقاومة الأمراض الفيروســـية فى النبات. بالدراسات المكثفة على الفيروسات النباتية كحاملة وناقلة لجينات النبـــات cloning vehicles H, vectors فإنه فى القريـــب العاجـــل يمكـــن إســـتعمال بعـــض الفيروسات النباتية بكفاءة عالية فى هذا الصدد.

يجب الإشارة هنا إلى وجود إختلاف بين الفيروسات الناقلة لجينات النبات plant viral vectors وبين البلازميد Ti، حيث يعتبر البلازميد Ti ناقل وحامل للجـــين مـــن النوع أو لطراز المكمل أو المتكامل integration-type vector. ولا يعتبر الفيروسات الحاملة والناقلة للجين من هذا النوع. يدخل الفيروس الجين المطلوب نقله إلى داخل النبات حيث أن الفيروس يصيب خلية النبات ويخترقها حاملاً معه الجين المطلـــوب. يتضاعف الجين فى خلايا النبات بلايين المرات نتيجة لتكاثر الفيروس داخـــل خلايـــا النبات بلايين المرات حيث يعتبر الجين أحد جينات جزيئات الفيروس. ونتيجة لـــذلك ينتقل الفيروس فى جميع أجزاء النبات وبالتالى ينتشر الجين فى جميع أجزاء النبات أى يكون إنتشاره جهازياً systemically.



شكل ١١٤أ: حقن بمص دقيق لـ DNA بلازميد منسوخ فى مسبق نـواة ذكريـة لبويضة فأر مخصب.



شكل ١١٤ب: حقن مورث لهرمون النمو فى البويضة لفأر مخصبة ينشأ منه فأر عملاق (يسار c وزنه حوالى ضعف أخيه (يمين).

إدخال الجينات المرغوبة إلى داخل النبات وذلك فى النباتات الحولية أو المعمـرة التى تتكاثر خضرياً بواسطة الفيروس أو فى النباتات التى تتكاثر بالبذور وذلك عـن طريق حمل البذور للفيروس ويكون نتيجة لذلك تواجد الجين فى النبات نتيجة لوجود الفيروس كما أن درجة تكرار الجين فى النبات تكون مرتبطة تماماً بسـرعة تكـاثر الفيروس ودرجة إنتشاره فى خلايا وأنسجة النبات المختلفة. يمكن أيضاً إدخال الجين

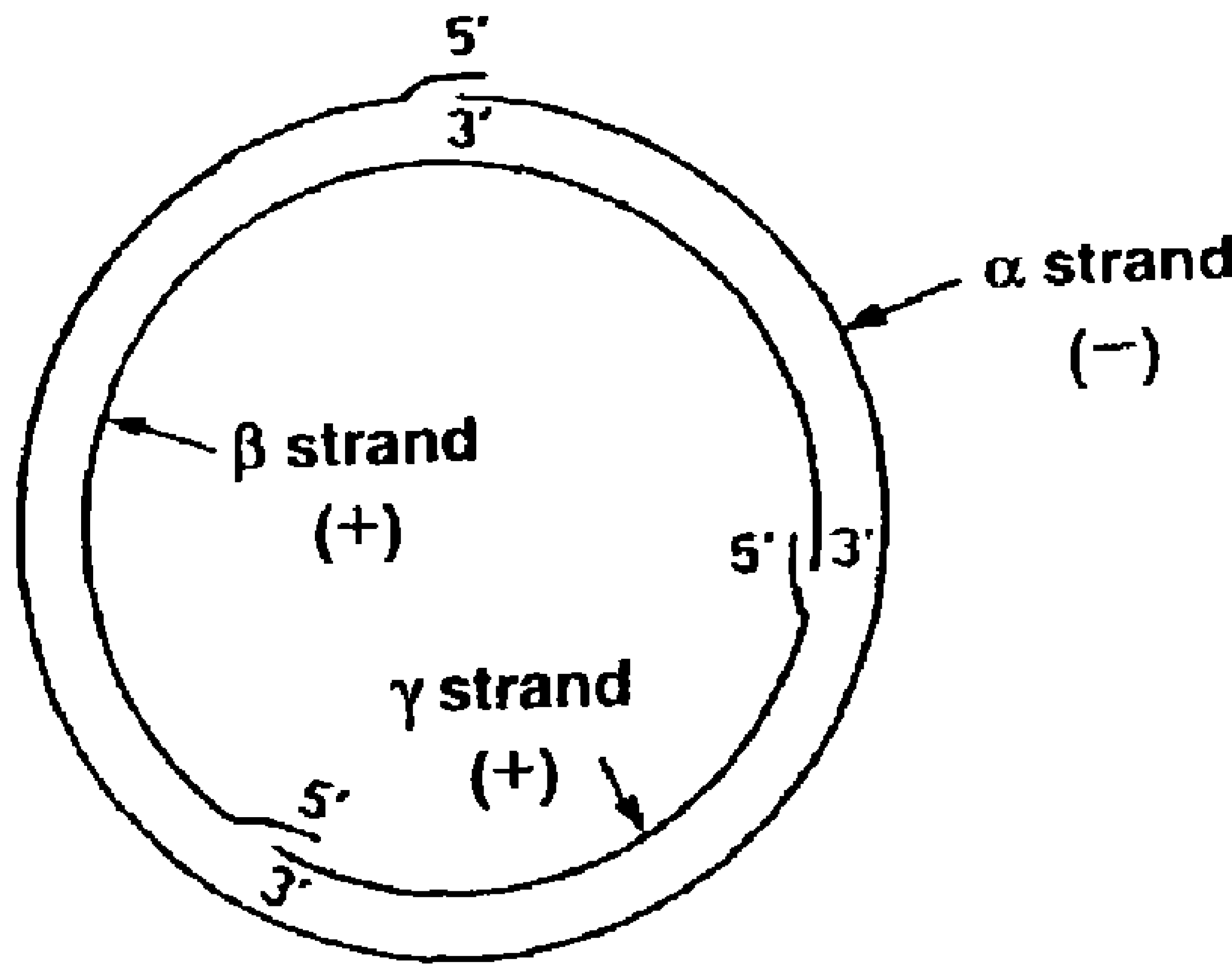
إلى خلايا النبات ومنها النباتات الحولية بواسطة التلقيح الميكانيكى mechanical inoculation حيث يمكن إدخال الفيروس إلى داخل النبات بهذه الطريقة ويمكن إدخال الجين بواسطة الفيروس فى النباتات المعمرة بواسطة التطعيم grafting. وفى هذه الحالات فإن الجين المنقول إلى النبات عن طريق الفيروس يمكن أن يسبب أو يظهر مقاومة جهازية ضد أنواع أو سلالات أخرى من الطفيل شديد القدرة على إصابة النبات وبذلك يقى النبات شر الإصابة. طبيعة نوع المقاومة التى يظهرها الجين ليقى النبات من الإصابة غير معروفة ولكن يعتقد أنها نوع من الحماية- المختلطة أى الوقاية المتضادة ومن الصعب ترجمة الإصطلاح الدال على هذه الحالة باللغة العربية ولذلك يفضل إستعمال المصطلح الإنجليزى وهو cross protection ومعناه أن وجود الجين بأعداد كثيرة فى داخل خلية النبات يمنع سلالة أخرى من الفيروس شديدة القدرة المرضية على مهاجمة الخلية.

يحدث ذلك بالنسبة لجميع خلايا النبات المحتوية على هذه الجينات وبالتالى تقى هذه الجينات المنقولة بالفيرس خلايا النبات المحتوية على هذه الجينات وبالتالى من الإصابة بالسلالة الشديدة القدرة المرضية. يمكن أيضاً أن تكون طبيعة المقاومة فى هذه الحالة نتيجة للمقاومة الجهازية systemic resistance ولذلك فإنه يعتقد أن تستعمل الفيروسات التى تصيب النبات كحاملات وناقلات للجين المطلوب vectors وأنها تختار وتنتخب بحيث أنها تكون قادرة على إختراق النبات وتتكاثر بداخله دون أن تسبب له أضرار أو نقص فى المحصول وتكون مهندسة وراثياً بحيث أن ما تحمله من جين أو جينات تسبب وقاية خلايا النبات من السلالة المرضية للطفيل. وفيما يلى وصف لبعض الفيروسات النباتية التى يمكن أن تقوم بهذا الدور:

أ – Caulimoviruses وهى عبارة عن فيروسات متساوية الأقطار isometric وقطرها حوالى خمسون نانومتر وتحتوى على DNA ثنائى الشريط أو الخيط حلقى يتكون من حوالى ثمانية آلاف زوج من القواعد النووية. كل خيط أو شريط منهما غير متصل أى متقطع حيث يوجد طرف من خيط على طرف آخر overlaps ويتكرر

ذلك فى بعض المناطق وطول الجزء الذى يحدث فيه overlaps حــوالى ٦-١٨ زوج من القواعد النووية.

يعتبر فيــروس تبــرقش القنبــيط cauliflower mosaic virus (CaMV) (شــكل ١١٦جــ) أكثر فيروسات هذه المجموعة دراسة كناقل vector للجين. ينقل الفيروس بسهولة نقل ميكانيكى وذلك بحكه على الأوراق وأيضاً ينقل بواسطة حشرات المــن وذلك فى نباتات العائلة الصليبية.



شكل ١١٤جــ: تركيب DNA فيروس موزايك القنبيط.

كلا من الفيروس و DNA الفيروس المعزول يســبب الإصــابة وتكــون إصــابة جهازية وتحتوى كل خلية من خلايا العائل نصف مليون جزيــىء فيــروس. ينســخ DNA الفيروس نواة خلية النبات العائل وأما mRNA المنسوخ فى النواة فإنه ينتقل إلى السيتوبلازم ويتكون منه الشريط السالب (−) من DNA وذلك بواســطة عمليــة نسخ عكسى revrese transcription ثم يتكون من الشريط الســالب شــريط آخــر موجب (+) من DNA ومنها يتكون DNA الثنائى الشريط أو الخــيط. أو أن mRNA يستخدم فى تخليق أنواع مختلفة من البروتين من ستة إلى ثمانيــة أنــواع ومنهــا البروتين الخاص بغلاف الفيروس viral coat protein. لا يدخل DNA الفيروس فى تركيب المادة الوراثية للنبات العائل ولا ينقل عن طريق البذور. وبالرغم من إمكانية

نقل ولصق DNA فى بلازميد *E. coli* أى عمل cloning لـــ DNA الفيــروس وأن DNA الفيروس يمكن عزله مرة أخرى من خلايا هذه البكتيريا ويكون قــادر علــى إصابة النبات. ولكن حتى الآن لا يمكن إستعمال هذا الفيروس CaMV كحامل وناقــل vector للجين أو الجينات حيث توجد عقبات فى ذلك.

وأحد هذه العقبات أن غالبية جينوم الفيروس يجب أن يعبأ مــع منــاطق الكــود coding regions التى يحتاجها الفيروس لتخليقــه وحيــث أن أى نقــص ملحــوظ deletion فى هذه الأجزاء يفقد قابلية الفيروس على الإصابة وبالتالى يصــبح عــديم الفاعلية فى عملية نقل الجينات. أحد مناطق الكود الخاص بــالفيروس تتكــون مــن ٤٠٠ زوج من القواعد النووية.

ب – Geminiviruses عبارة عــن زوج paired (أى Gemini) مــن جزيئــات الفيروس وكل جزيىء يتراوح طول أحد قطريه ١٨–٢٠ نانومتر وطول القطر الآخر ٣٠ نانومتر. كل زوج من جزيئات الفيروس يحتوى جزيــىء DNA مفــرد حلقــى ومفرد الشريط أى الخــيط single stranded DNA (ssDNA) ويتكــون الخــيط أى الشريط الواحد من ٢٥٠٠ قاعدة نووية. ولكن عديد من فيروسات هذه المجموعة له جينوم ينقسم إلى جزئين من DNA متساويين فى الحجــم ولكنهمــا يختلفــان فــى شفرتيهما ويكونان مكونــات مختلفــة coding for different things يبــدو أن كــل فيروس من فيروسات هذه المجموعة يحتوى على نوعين مختلفين مــن الجزيئــات two populations أى عشيرتين مختلفتين حيث أن العشيرتين تتمــاثلان فــى نــوع بروتين الغلاف أو الغطاء coat ولكنهما يختلفان فى تتابع النيكليوتيدات فــى DNA. تدخل هذه المجموعة من الفيروسات إلى داخل نواة خلية النبــات العائــل وتتكــاثر بداخلها. تنقل هذه الفيروسات فى الطبيعة بواسطة نطاطات الأوراق أو الذباب الأبيض وتكون من النوع والحالة persistent يمكن أن يصعب أو يستحيل نقلهــا ميكانيكيــاً. يعرف القليل عند عدد ونوع وموقع جينات هذه الفيروسات وأيضاً تركيب المحفــزات أى المهيأت promoters الخاصة بها.

وبالرغم من أن هذه الفيروسات تكون DNA وحيد الشريط أى الخيط فأنها تكون فى مرحلة وسطيه فى النواة لخلايا النبات العائل DNA ثنائية الشريط أى الخيط dsDNA. أمكن عزل هذا النوع الأخير من DNA ويمكن أن يصيب بروتوبلاست خلايا النبات ويمكن أيضاً إدخاله كجزء من بلازميدات خلايا البكتيريا. تصيب الفيروسات التى تتبع هذه المجموعة نباتات ذوات الفلقة وذوات الفلقتين. يوجد أيضاً صعوبات تواجه إستعمال هذه الفيروسات كحاملات وناقلات لجينات النبات vectors ومنها أنها تحتوى على جينومات صغيرة الحجم وأيضاً صعوبة نقلها ميكانيكياً بواسطة الخلية cell sap. وعامة تبذل مجهودات كبيرة لتسهيل إمكانية إستخدام هذه الفيروسات كناقلات وحاملات لجينات النبات vectors.

جـ - فيروسات RNA (RNA Viruses) يمكن أن تكون مهمة فى المستقبل وخاصة الفيروسات عديدة المكونات multicomponent viruses ومنها مجموعة بروموفيرس bromovirus ومنها فيرس موزايك البروم brome mosaic virus ومجموعة الفيروسات التابعة satellite viruses وهى فيروسات تلتصق وترتبط بفيروسات أخرى وتسبب الفيروسات التابعة خفض سرعة تكاثر الفيروسات المرتبطة به كما أنها تقلل من قدرته على إصابة النبات هى طفيليات للفيروسات المرتبطة بها.

وقد أمكن فى حالة فيروس موزايك البروم إحلال RNA أو cDNA محل RNA بروتين الغطاء أو الغلاف coat وذلك فى أصغر جزيىء من جزيئاته الثلاثة ودون تأثير على قدرة الفيروس على الإصابة. وفى حالة الفيروسات التابعة ورنا التابعة والتى تتراوح أحجامها من ٢٧٠ إلى ١٥٠٠ زوج من القواعد النووية فإن هذه الفيروسات لا تحتاج RNA ويمكن إحلاله كلية أو جزئياً بـ RNA غريب foreign أو حتى بـ cDNA وبالتالى يمكن إدخال هذه الأجزاء الغريبة عن الفيروس إلى داخل خلية النبات العائل عن طريق إصابتها بجزيئات الفيروس. تركيب هذه الفيروسات وإستعمالها كحاملات وناقلات vectors لجينات النبات تحت الدراسة مع وجود إحتمالات كبيرة لإنجازها.

الفيرويدات Viroids تعتبر جزيئات RNA عارية صغيرة الحجم حلقية وحيدة الشريط أى الخيط ssRNA وتتكون من عدد من الوحدات يتراوح بين ٣٠٠-٤٠٠ قاعدة نووية. تنقل الفيرويدات ميكانيكياً وتتكاثر فى نواة خلية العائل وإصابة النبات العائل فيها جهازيه. خواص الفيرويدات مشجعة جداً لأن تكون ناقلة وحاملة vectors لجينات النبات وبالرغم من ذلك فإنه حتى الآن لا يوجد أى فرد منها يقوم بذلك. الفيرويدات لا تعتبر فيروسات إطلاقاً.

إستخدام الليبوسومات Liposomes:

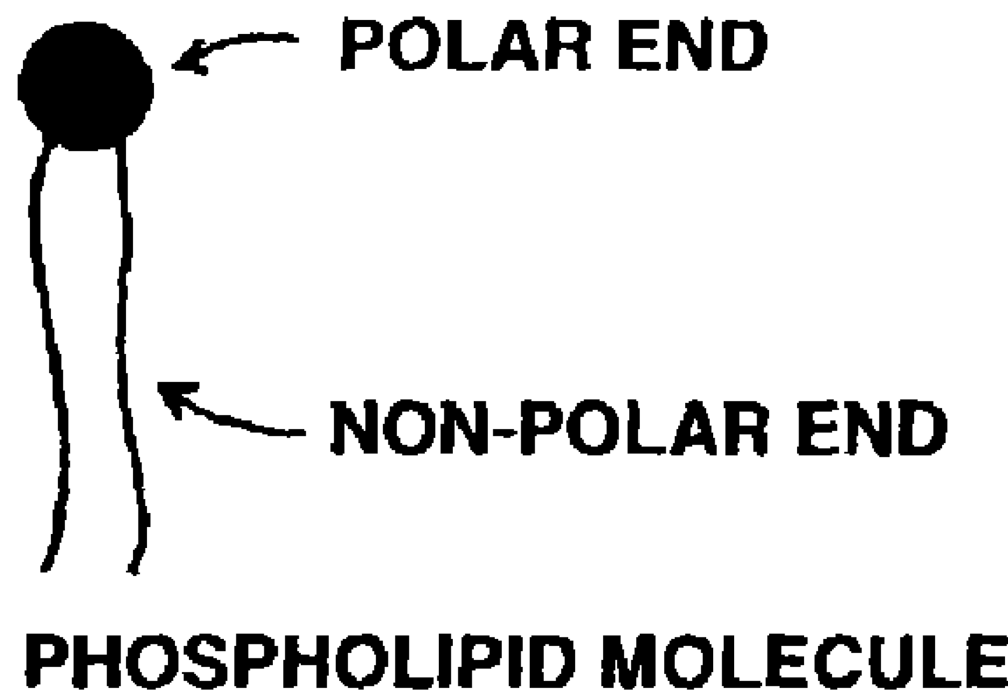
تستخدم الليبوسومات فى إدخال دنا أو رنا حتى إدخال أدوية أو غيرها داخل خلية الحيوان أو بروتوبلاست النبات أو الفطريات. يتكون الليبوسوم وهو تركيب صناعى liposome كروى الشكل أو شبه كروى عادة ويكون أجوف فى المركز ويتكون من جدار دهنى يتكون من جزيئات من فوسفولييبيدات مرتبة بجانب بعضها وموجودة فى طبقتين bilayer (شكل ١١٤ د).

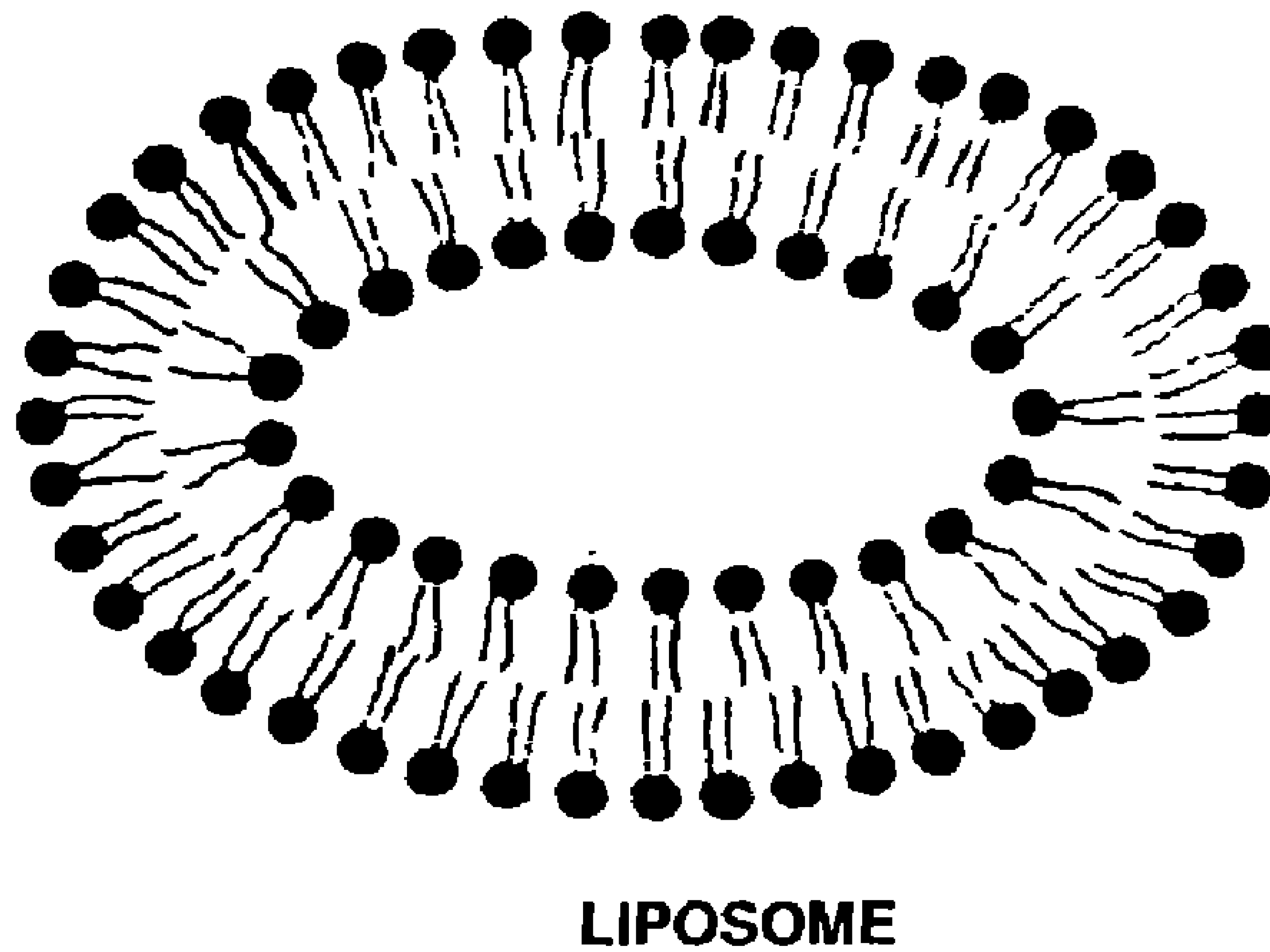
جزيىء الفوسفولييبيد الواحد يتكون من رأس كروى قطبى وذيل غير قطبى عبارة عن خيطين. يستخدم الليبوسوم كناقل وسيط متحرك صناعى artificial vehicles لنقل وإدخال دنا أو رنا أو أدوية أو مضادات حيوية داخل خلايا الحيوان وبروتوبلاست النبات والفطريات وغيرها وذلك بعد خلطه معها. يلتقم وينفذ الليبوسوم رنا ودنا بسهولة ويصبح حاوى لها وبعد ذلك ينقله إلى خلية الحيوان أو الإنسان أو بروتوبلاست النبات أو الفطر أو البكتيريا وغيرها من تحضين المخلوط فى الحضان فى درجة حرارة مناسبة وبيئة مناسبة.

إستخدام البروتوبلاست الكروى البكتيرى Spheroplast:

حيث أن peptidoglycan هو المركب الوحيد الصلب فى جدار خلية البكتيريا. وحيث أن peptidoglycan هو المركب الذى يهاجم ويتحلل بإنزيم الليزوزيم Peptidoglycan the site of attack of thee enzyme lysozyme.

فإن معاملة خلايا البكتيريا بهذا الإنزيم يسبب تحلل الجدار ويصبح بروتوبلاست خلية البكتيريا حر ويكون دائماً وعادة كروى الشكل سواء خلية البكتيريا كروية أو عضوية أو حلزونية أو واوية ألخ.





شكل ١١٤ د: جزئ فوسفوليبيد وليبوسوم.

وعامة يسمى الناتج من خلية البكتيريا بعد هذه المعاملة باسم **spheroplast** حتى مع وجود بعض بقايا وآثار من الجدار عالق بالبروتوبلاست. وهذا البروتوبلاست الكروى البكتيرى **spheroplast** يحتوى بلازميد يحمل جينات غريبة مطلوب نقلها إلى داخل خلية الحيوان او الإنسان أو بروتوبلاست النبات أو الفطر أو الطحلب. ولذلك يخلط هذا البروتوبلاست الكروى البكتيرى مع الخلية أو البروتوبلاست المراد نقل الجين إليه. فيحدث إتحاد مباشر بين الخلية أو البروتوبلاست مع **spheroplast** وهكذا تنتقل الصفة إلى الخلية أو بروتوبلاست النبات.

تكوين النبات الكامل أو المحول والحيوان الكامل أو المحول:

فى حالة النباتات الراقية والحيوان نحتاج نبات كامل محول أو حيوان كامل محول وليست خلية واحدة. فى النبات من السهولة بمكان عمل ذلك حيث يمكن تحويل خلية واحدة أو حتى بروتوبلاست ثم زراعتها بطرق زراعة الأنسجة المختلفة حيث يمكن الحصول على نبات كامل محول من هذه الخلية المحولة حيث أنها تنقسم عديد من الإنقسامات لتعطى النبات الكامل المحول كما سبق شرحه ويعطى أزهار وبذور محولة وهكذا يمكن نقل عملية التحويل إلى النسل.

والعكس صحيح فى حالة الحيوان حيث لا يمكن الحصول على حيوان محول من خلية واحدة محولة كما فى النبات ولذلك يتم عمل ذلك بطريقة أخرى حيث يتم إزالة وعزل البيضة من أنسجة الأم ثم يتم حقنها بواسطة دنا المطلوب نقل صفاته لخلية البيضة ثم يتم زراعة البيضة مرة أخرى فى المكان المناسب من الجهاز التناسلى للأم أو لأى أم ويتم عمل هذه الطريقة بكثرة فى الحيوانات الثديية ومنها فئران التجارب وغيرها كثير.

أما عن مولد النعجة دوللى فقد حدث لها ما سبق شرحه دون إدخال دنا للخلية أى أنها الخطوات الأخيرة مما سبق شرحه دون إدخال لدنا فى الخلية ولذلك لا تعتبر حالة النعجة دوللى حالة هندسة وراثية بل تعتبر حالة مزوارع الأنسجة أو حالة هندسة خلوية تم التحضين فيها فى أنسجة أو طبيعية.

فى أواخر عام ١٩٩٦، وفى مزرعة بحثية لعلوم الإنتاج الحيوانى بمعهد روزالين بأدنبرة، سكوتلاندا بالمملكة المتحدة، ولدت نعجة وولد معها إنجاز علمى متميز وبالغ الأهمية فى مجال علم البيولوجى ... هذا الحدث يبشر ويؤكد على كون القرن القادم سوف يشهد ثورة بيولوجية كبيرة. أثار نبأ ولادة النعجة التى أطلق عليها إسم دوللى والذى أعلن عنها لأول مرة فى فبراير ١٩٩٧ دوى هائل فى جميع الأوساط العلمية وغير العلمية فى دول العالم، وثار الجدل بين المتخصصين وغير المتخصصين حول المغزى لهذا الإكتشاف الفريد.

لقد وصف هذا الكشف العلمى من قبل المتخصصون بأنـه يعـادل فـى ماهيتـه إكتشاف الطاقة الذرية .. لماذا؟ هذا لأن النعجة دوللى لم تنشأ وتتطور مـن خـلال الطريقة التقليدية والمعروفة فى دورة حياة هذا الكائن الحى، والتى تشـمل الإكثـار الجنسى الذى من خلاله تلتقى خلية أحادية ذكرية مع خلية أحاديـة أنثويـة فينـتج الجنين الزيجونى الذى يجمع ما بين صفات الأبوين المشاركين بخلاياهما الجنسـية. لقد نشأـ وتطورت النعجة دوللى من نواة خلية جسدية فصلت من نعجة وزرعت فى رحم نعجة أخرى. وبذلك فقد حملت النعجة دوللى التركيب الوراثى بجميـع الجينـات التى يحويه هذا التركيب، بالتالى كانت النعجة دوللى صورة مطابقة فى جميع الصفات للنعجة الأم التى فصلت منها الخلية الجسدية.

وهنا يجب الذكر أن هذا ليس خرقاً لقانون الطبيعة، بل هو تطبيقاً لعمـق فهمنـا لميكانيكية عمل والأساس البيولوجى الذى يحكم سلوك الخلية التى هىوحـدة بنـاء الكائن الحى. مما لا جدل فيه أن هناك أسباباً قوية ومنطقية وراء التجارب العمليـة التى تجرى بالمعامل البحثية تحت إشراف العلماء فى المجالات المختلفة .. فم يكـن إستنساخ دوللى وليد لفكر علمى أجوق لا يستم بالمنطقية فى محتواه، بل يهدف إلى تطويع العلم والمعرفة من أجل خدمة البشرية والإستفادة من النجاح فى الحد أو على الأقل تخفيف معاناة الجنس البشرى وتوفير حياة أفضل من خلال تسخير هذه المعرفة فى إيجاد مصدر ملائم لتوفير المتطلبات من العقاقير الطبية، تحسين الثروة الحيوانية والمنتجات المتعلقة بها، وغيرها من التطبيقات.

لقد شهدت السنوات القليلة الماضية تقدماً باهراً وملموساً فى مجال علم الهندسة الوراثية، كما انبهرت الشعوب بالقدرات الفائقة التى يمكـن أن تتحقـق مـن خـلال تطبيقات هذا العلم الحديث العهد، حتى أن أصبح الغالبية العظمى من غير المشتغلون والمهتمون بهذا الفرع من العلم تشير إلى أى تقدم فى مجال البيولـوجى إلـى علـم الهندسة الوراثية؟ وهنا يجب الذكر أنه ليس هناك علاقة ما بين دوللـى والهندسـة الوراثية بأى صلة من الصلات .. بل يمكن القول أن دوللـى هـن نتـاج الزراعـة

والهندسة الخلوية، وهذه قد تكون بدورها النواة لبداية فرعاً جديداً من العلو البيولوجية. والآن وقد تلمسنا بعض الملامح الأساسية لهذا الكشف العلمى، فإننا نوضح التجربة كاملة .. فى التجربة التى أجراها الفريق البحثى بقيادة العالم إيان ويلموت والتى أثمرت عن النعجة دوللى، أجرى إستخدام تراكيب خلوية مختلفة وفيها تم فصل نواة من خلية جسدية من ضرع نعجة بالغة، ونقلها إلى سيتوبلازم بويضة بعد إزالة النواة الأحادية منها، وهنا يجب الذكر أن هذه البويضة قد فصلت من نعجة أخرى.

ولقد تم إجراء عملية الإندماج لهذه التراكيب الخلوية بواسطة استخدام تقنيات زراعة الأنسجة وتنشيط إندماج الخلايا بواسطة إستخدام جهاز مصمم لهذا الغرض يعتمد على إمرار تيار كهربائى فى البيئة التى تحتوى هذه التراكيب من أجل تسهيل تجاور هذه التراكيب ثم إندماجها معاً. وبعد أن يتم التحقق من نجاح الإندماج بين هذه التراكيب الخلوية، فإنه يتم التأكد من مقدرة الخلية التى تحمل نواة جسدية وسيتوبلازم بويضة على الإنقسام ... ثم يلى هذا زراعة الجنين ذو العدد المحدود من الخلايا فى رحم نعجة أخرى. ولقد تطور الجنين فى الرحم وتشكلت خلاياه وأعضاءه فتكونت النعجة دولل التى أثبتت بما لا جدال فيه مقدرة الخلية الجسدية الحيوانية على تكوين كائن حى كامل دون الحاجة إلى التلقيح والإخصاب. هذا فى معناه يشير إلى أن الخلية الحيوانية تكون قد حققت ما حققته الخلية النباتية منذ سنوات عديدة مضت فى كونها totipotent cell. حقيقة فإن هذا الأمر لم يكن وليداً للصدفة، ولم يكن أيضاً سهلاً فى الحصول عليه .. فلقد أمضى العلماء وقتاً وجهداً كبيراً من أجل تحقيق هذا الهدف.

وتعتبر ولادة دوللى هى الحالة الناجحة الوحيدة فى سلسلة من المحاولات الجادة التى وصل عددها إلى ٢٧٧ محاولة. وهنا نتساءل لما نجحت هذه التجربة؟ وما هى أسباب فشل التجارب الأخرى؟ لقد عرفنا أن مقدرة الخلية الجسدية على تكوين كائن حى كامل تعتمد على مقدرتها على التحول من حالة التميز إلى حالة اللا تميز ثم

الدخول فى برنامج جينى جديد. هذا التحول يحدث على المستوى الخلوى فى العديد من المراحل، ويحدث تغيرات جوهرية خلال هذه المراحل المختلفة فى العمليات الحيوية التى تجرى بداخل الخلية. من الهام أيضاً الذكر أن هناك العديد من العوامل المتداخلة والمتشابكة التى تؤثر على نجاح تحول الخلية من برنامج إلى برنامج آخر .. هذه العوامل تشمل المرحلة من الدورة الخلوية التى تفصل فيها الخلية الجسدية من أجل إعادة برمجتها إلى البرنامج الجينى، كما تشمل أيضاً المرحلة التى تفصل فيها البويضة من أجل نقل النواة الجسدية إلى السيتوبلازم. ليس هذا فقط بل أن هناك تأثير لبعض المعاملات التى تجرى على التراكيب الخلوية قبل وخلال إجراء الإندماج، كما أن هناك تأثير للتركيب الوراثى، والبيئة المنزرع بها الجنين، وغيرها من العوامل العديدة الأخرى. نظراً لتداخل تأثير هذه العوامل معاً فإنه من الصعب فصل تأثير إحداها عن الأخرى .. هذا فى ذاته يعتبر من المعوقات التى تواجه العلماء الباحثين فى هذا المجال والمهتمين بالبحث عن الأساس الخلوى الذى يتحكم فى هذه الظاهرة. هذه هى الأسباب التى أدت إلى نجاح حالة واحدة ضمن العديد من المحاولات والتجارب العملية للحصول على جنين من خلية جسدية.

ويجب الذكر أن هذا الإكتشاف البيولوجى كان يسبقه العديد من التجارب والمحاولات الخاصة بنقل الأنوية من خلايا متخصصة وزراعتها فى سيتوبلازم بويضة غير مخصبة .. مما لا شك به أن نتائج هذه التجارب مهدت الطريق لتحقيق النجاح فى الحصول على جنين وكائن حى كاملاً من الخلية الجسدية المنفصلة من نسيج لضرع النعجة.

وبعد نجاح ذلك تم عمل ذلك فى دول أخرى مثل الولايات المتحدة الأمريكية واليابان وتم عمل حيوانات بنفس الفكرة وقد تكون الطريقة محورة عن ذلك إلى حد ما ومن هذه الحيوانات الفئران.

وهكذا فإن التقدم فى زراعة خلية نبات واحدة ويتم عمل نبات كامل منها على بيئات صناعية قد تم بنجاح فى الستينيات. ولكن فى الحيوان والإنسان لابد من

زراعة البيضة المخصبة أو المعاملة بالهندسة الوراثية فى أم حاضنة يكبر فيها الجنين وكما سبق شرحه فى دوللى. وفيما يلى مثال آخر فى الأبقار.

إزالة البيض الزائد من رحم أنثى الأبقار ذات السلالات المتميزة بإنتاج عالى من اللبن ثم يتم تلقيح البيض فى المعمل فى أنابيب الأختبار فى عدم وجود الأنثى أو الذكر أى *in vitro* بواسطة حيوانات منوية من ذكر الأبقار ويكون ذو تركيب وراثى متميز وأن تحمل حيواناته المنوية صفات متميزة وقد يكون لها علاقة بإدرار اللبن. يأخذ البيض الملقح ويوضع أى يزرع Implanted فى الجزء المخصص له من الجهاز التناسلى لأنثى أبقار من سلالات تتميز بأنها ذات إدرار لبن منخفض. تكون النتيجة أن هذه الإناث الأخيرة تلد أبقار يمكن أن تكون ذات إدرار عال من اللبن.

تكوين النبات الكامل من بروتوبلاست مفرد أو خلية مفردة:

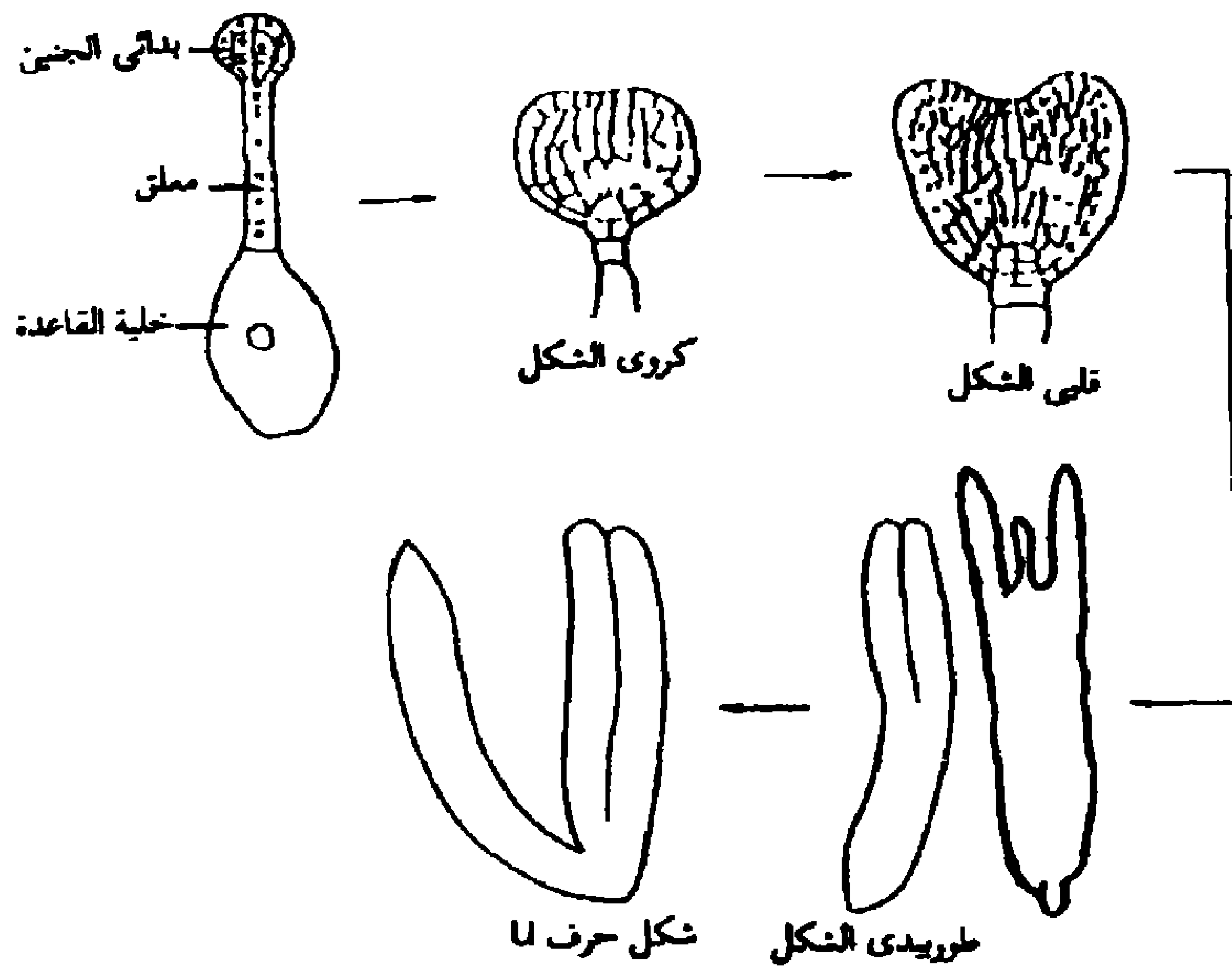
Generation of an intact plant from one cell or protoplas

يمكن من البروتوبلاست العارى والذى يكون جدار ليصبح خلية أو من الخلية المفردة أصلاً إنتاج نبات كامل. حيث يزرع البروتوبلاست أو الخلايا المفردة على بيئات خاصة (جدول ٨). ثم ينقل الناتج على بيئات أخرى حتى تكوين النبات الصغير plantlet.

ويحدث على البيئة إنقسام الخلية الناتجة من البروتوبلاست أو الخلية المفردة أصلاً تكون كتلة من الخلايا تتشكل لتكوين شكل قلبى ثم شكل طوربيدى ومن هذا الشكل يتكون النبات الصغير (شكل ١١٤هـ).

جدول ٨: بيئة تستعمل فى مزارع البروتوبلاست

المكونات	التركيز (ملليجرام/لتر)
أملاح معدنية	
كبريتات الأمونيوم	٧٩٠
نترات الكالسيوم	٢٩٠
كبريتات المغنيسوم	٧٣٠
كلوريد بوتاسيوم	٩١٠
نترات بوتاسيوم	٨٠
نترات صوديوم	١٨٠٠
كبريتات صوديوم	٤٥٠
فوسفات صوديوم ثنائية الإيدروجين	٣٢٠
حامض بوريك	١,٥
كبريتات نحاس	٠,٠٢
كلوريد المنجنيز	٦
يويد البوتاسيوم	٠,٧٥
كبريتات الزنك	٢,٦
حامض الولبديك	٠,٠٠١٧
كلوريد الحديديك	٣,١
أثيليت ثنائى الأمين رباعى الخلات الصوديومى EDTA	٨
فيتامينات وأحماض أمينية	
ميسو إينوسيتول meso-inositol	١٠٠
جليسين	٣
ثيامين	٠,١
كلوريد البيروكسين	٠,١
حامض nicotinic	٠,٥
منظمات النمو	
2,4-D	٠,١٥
كينتين	٠,١٥
مصدر الكربون	
سكروز	٢٠ جرام
آجار	٢٠ جرام



شكل ١١٤هـ: خطوات تكوين النبات الصغير **plantlet**.

ويكون ذلك على بيئات صناعية معينة فى الخطوات المختلفة (الجداول من رقم ٩ إلى رقم ١٦) وذلك لنباتات من المحاصيل مثل الذرة والقمح والفاكهة مثل المـوالح والمانجو وللخضر مثل البطاطس والطماطم والزهور ونباتات الزينة مثل البيجونيا.

وفيما يلى طريقة إنتاج نبات تبغ كامل من مزارع حبوب اللقاح ثم مـن مـزارع البروتوبلاست من خلايا ميزوفيل أوراق نبـات تبـغ أحاديـة ثـم التهجـين بـين البروتوبلاست الأحادى لتكوين خلية ثنائية ومن هذه الخلية على بيئات يـتم تكـوين النبات الصغير ثم النبات الكامل وفيما يلى شرح مثال لذلك لنبات تبغ حساس للضوء (شكل ١١٤ و).

طريقة إنتاج نباتات دخان هجين غير حساسة للضوء بواسطة مزارع الأنسجة

فى هذه الطريقة نبدأ بنبات حساس للضوء حيث أنه فى درجة الضـوء العـادى وهى 10000 Lux يكون النبات ضعيف ولا يأخذ اللون الأخضر ويصبح لونه مصـفر

أو أخضر باهت ويكون تركيب هذا النبات VV أو SS ثم يؤخذ من أزهار هذا النبات المتك عن طريق الخلايا الأمية لحبوب اللقاح PMS.

ومن هذه الخلايا الأمية لحبوب اللقاح يتكون رباعى حبوب اللقاح ثم يتكون من هذا الرباعى حبوب اللقاح ويتكون من حبة اللقاح على البيئة كتلة من الخلايا تتميز على البيئة إلى شبه جنين قلبى الشكل ثم طوربيدى الشكل ومن هذا يتكون النبات الصغير وتركيبه V أو S وهذا النبات الصغير يكون haploid أحادى الأساس الكرموسومى أى أنه V أو S وليس VV أو SS لأنه ناتج من حبوب القاح ويتكون هذا النبات من نسيج الكالس.

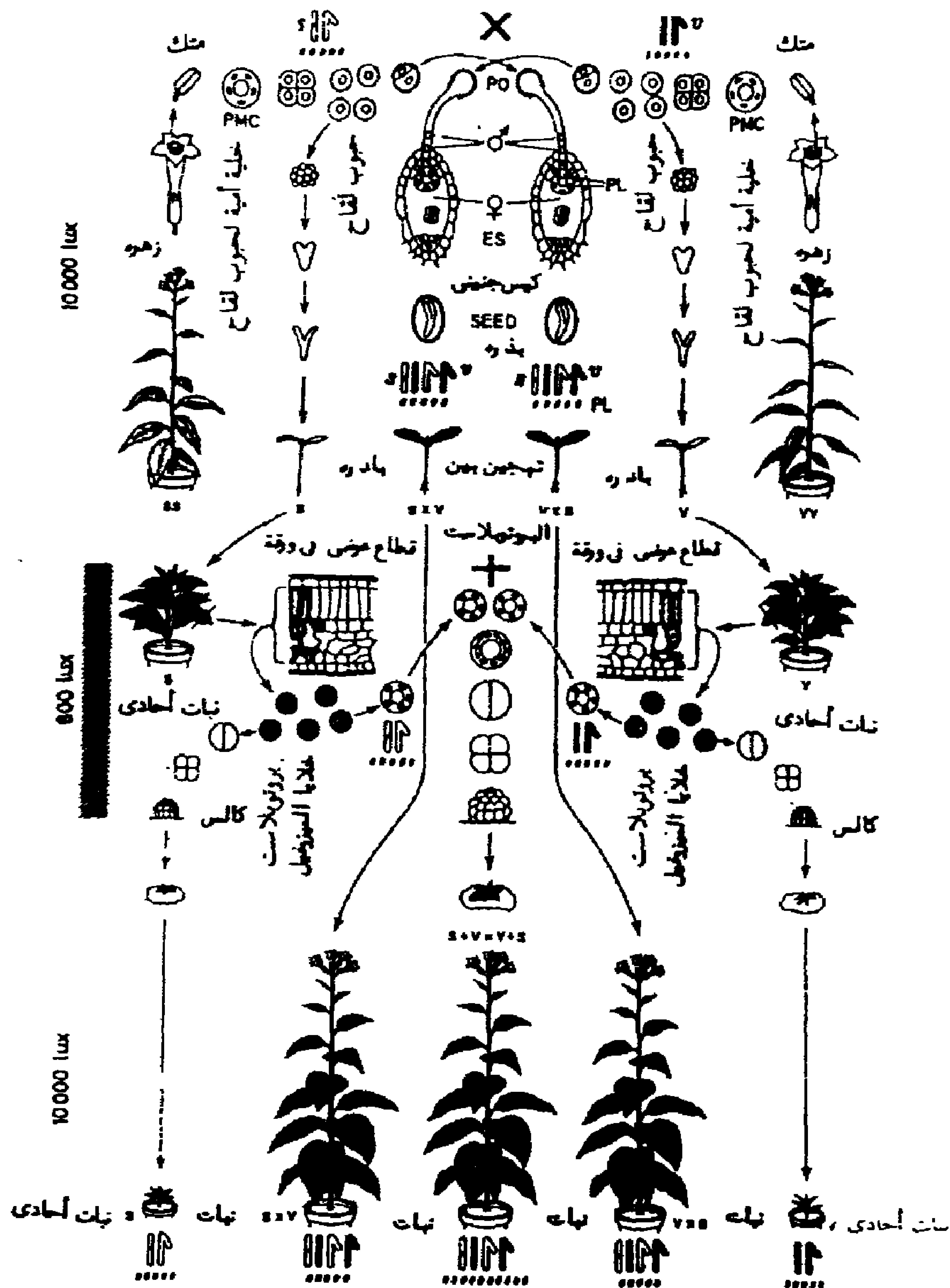
ثم يؤخذ هذا النبات الصغير الأحادى الأساس الكروموسومى وينمى فى درجة ضعيفة من الإضاءة وهى 800 Lux حيث تصبح البادرة والنبات المتكون فى الإضاءة الضعيفة ولأنه حساس للضوء يكون اللون الأخضر العادى وهذه حالة طريقة وهى حالة عكسية لما هو شائع فى جميع النباتات حيث أن جميع النباتات العادية فى وجود الإضاءة العادية يكون لونها أخضر وفى حالة الإضاءة الضعيفة يحدث لها شحوب ضوئى وتصبح خضراء باهتة أو مصفرة ولكن العكس صحيح فى هذه الحالة لأننا بدأنا بالنباتات الحساسة للضوء حيث أنه فى درجة الإضاءة العادية تكون خضراء باعتة وفى درجة الإضاءة المنخفضة تكون خضراء عادية اللون.

ومن هذه النباتات يؤخذ جزء من نسيج الورقة ومن الخلايا الكلورانشيمية لنسيج الورقة يؤخذ البروتوبلاست أى يتم عمل مزارع البروتوبلاست على بيئة مناسبة (جدول ٨) ثم يحدث التزاوج بين البروتوبلاست xV البروتوبلاست S ليتكون كتلة من الخلايا ونسيج كالس ويتكون نبات هجين heterozygous SV ولأن هذا النبات غير متماثل أى خليط فى تركيبه الوراثى heterozygous يتميز بأنه نبات عادى.

ففى درجة الإضاءة العادية وهى 10000 Lux يكون نبات عادى وذلك عكس الأبوين VV، SS حيث أن كل من الأبوين homozygous متماثل التركيب الوراثى.

بالفعل عندما أجرى تنمية البروتوبلاست فقط دون تزاوج فقد نـتج نبـات أحـادى haploid من مزارع البروتوبلاست تركيبه V أو S ويكون هذا النبات ضعيف مصفر لأنه حساس للضوء العادى (شكل ١١٤و) وهكذا يمكن إنتاج نبات خليط فى تركيبـه الوراثى بالتهجين العادى وبمزارع الأنسجة.

سبق ذكر الكالس وسيلى ذكر مزارع الكالس وفيما يلى ملخص عن ذلك.



شكل ١١٤و: التهجين فى نبات التبغ وإستعمال مزارع الأنسجة.

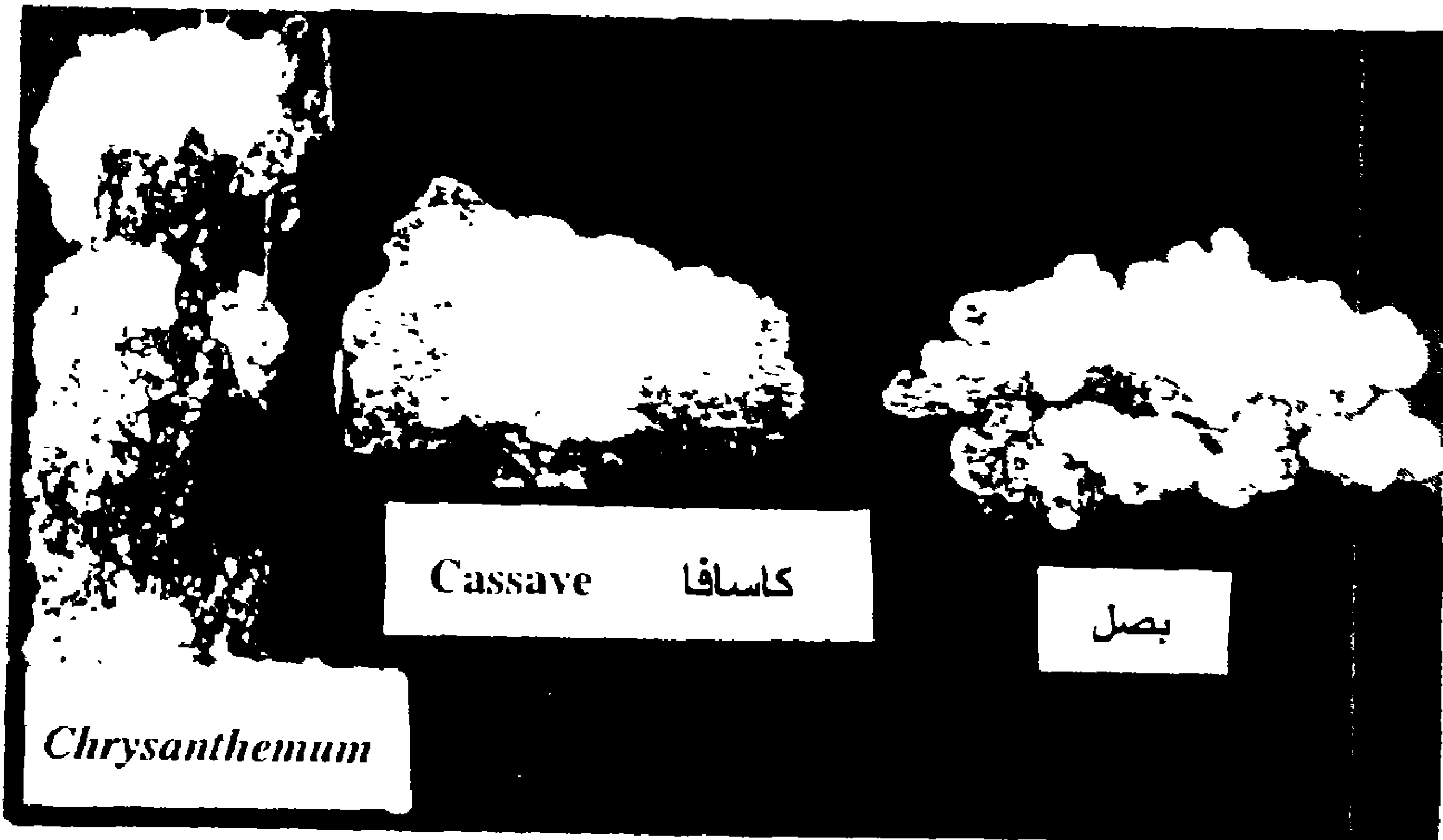
مزارع الكالس

Callus Culture

تعريف الكالس Callus:

هو عبارة عن كتلة من خلايا رقيقة الجدر disorganized cells يتخللها خلايا مرستيمية قد تكون هذه الخلايا المرستيمية على سطح نسيج الكالس كما فى نبات الشقيق وقد تكون فى داخل نسيج الكلس كما فى الكلس الناتج من الساق القرصية للبصل وقد يكون نسيج الكلس هش وقد يكون صلب وقد يكون أملس وقد يكون ذو نتوءات وفى حالة وجد الضوء فإنه يمكن أن تتكون فى الخلايا بلاستيدات خضراء وتصبح خلايا كلورانشيمية. (شكل ١١٤ك).

وفى حالة المعاملة بمركبات معينة مثل منظمات النمو يمكن أن تتميز خلايا نسيج الكلس إلى اللحاء والخشب. وفى بعض الحالات قد يتكون فى نسيج الكلس وفى داخل الخلايا فجوات عصارية ملونة ويصبح الكلس ملون وذلك كما فى نبات *Haplopappus* وحيث ينتج الكلس من بتلات الأزهار لهذا النبات وأن هذه البتلات تكون ملونة. وهذه الصبغات الملونة عبارة عن صبغة الأنثوسيانين anthocyanine.



شكل ١١٤ك: نسيج الكلس فى نباتات مختلفة.

بعض الصفات الخاصة لنسيج الكلس:

يمكن أن يستعمل نسيج الكلس فى مزارع الأنسجة فى إنتاج نباتات أو أجـزاء أو أعضاء نباتية ولكن من المعروف أن نسـج الكلس فى حالات كثيرة يكون غير ثابت من ناحية التركيب الكروموسومى أى من الناحية الوراثية حيث أنه كثيراً ما نجد فـى نسيج الكلس خلايا تختلف فى عدد الكروموسومات ويوجد أيضاً فى بعـض الخلايـا حـالات chromosomal aberrations ومنهـا التضـاعف duplication والـنقص deletion والإنقلاب inversion والإنتقـال translocation وحـالات أخـرى وهـى التضاعف aneuploidy و polyploidy وهى التضاعف فى عدد الكروموسومات أو قلة وزيادة الكروموسومات حيث نجد أن الخلية الثنائية تصـبح رباعيـة وقـد تصـبح سداسية.

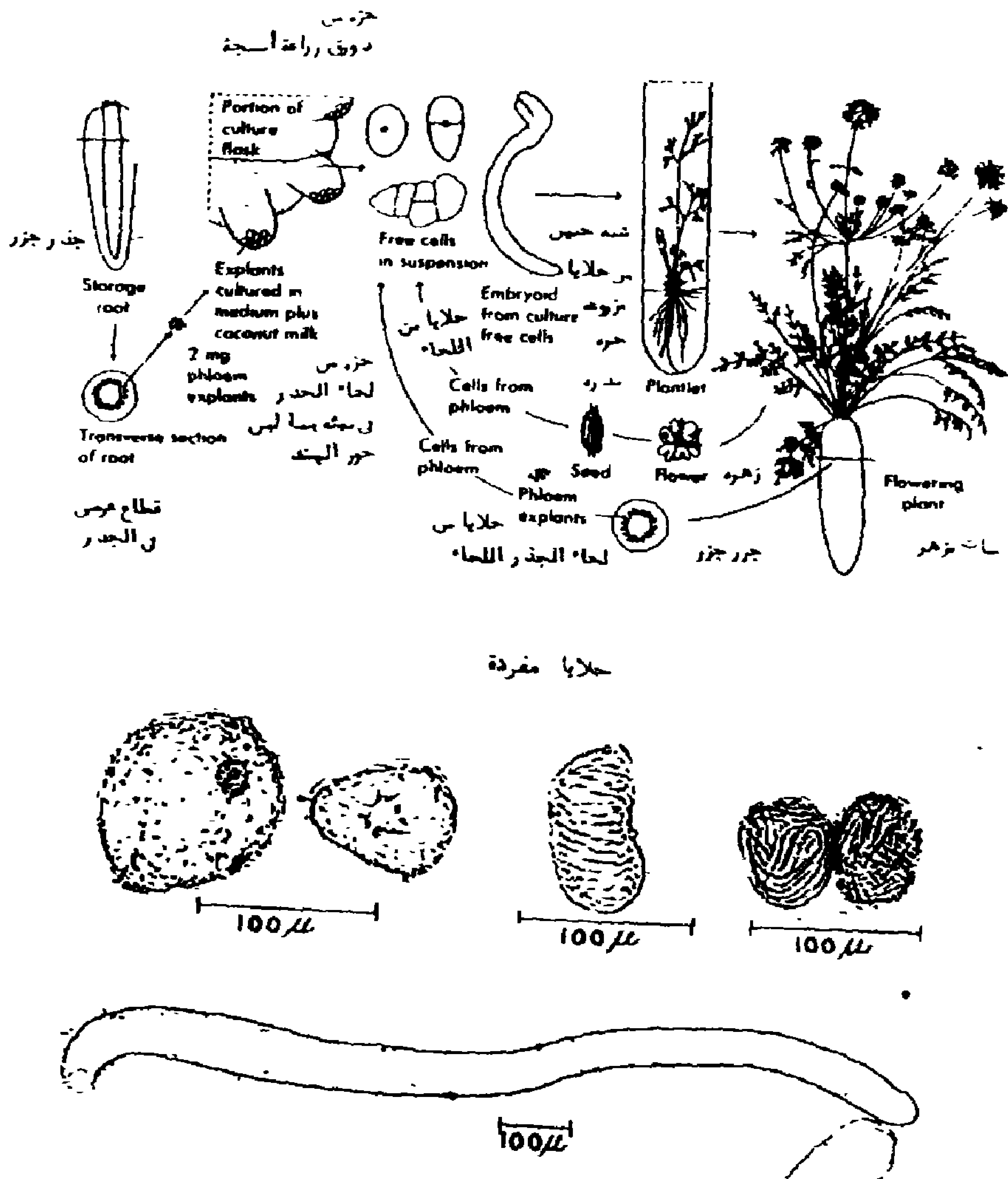
أما فى حالات التضاعف aneuploidy الناقص فتنشأ حالات مختلفة منهـا علـى سبيل المثال وليس على سـبيل الحصـر حـالات نقـص كروموسـوم واحـد 2n-1monosomic ونقص ٢ كروموسوم nullisomic 2n-2 وقد يزيد النقص 2n-3 و 2n-4 و 2n-5 وهكذا وقد يزيد عدد الكروموسومات واحد ويسمى trisomic 2n+1 وقـد يزيد عن ذلك ولذلك فإن جميع هذه الإختلافات فى أنواع الخلايا توجـد فـى نسـيج الكلس.

ولذلك لا يفضل فى بعض الأحيان إستخدام الكالس فى إنتاج نباتات جديدة لإختلافه الكبير فى التركيب الوراثى فى الخلايا المكونة لهذا النسيج.

إنتاج نباتات من نسيج الكالس

تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى إنتاج بعض النباتات ومثال لذلك إنتاج نبات الجزر من جزء من جذر النبات حيث يتم قطع الجذر ويؤخذ جزء صغير من داخـل الجـذر ويوضع على بيئة مناسبة فيتكون نسيج الكالس من هذا الجزء من الجـذر. ويؤخـذ نسيج الكالس ويوضع فى جهاز يشبه جهاز الطرد المركزى أو يوضـع فـى دوارق

مخروطية ويعرض لهز مستمر على الـ shaker فينتج عن ذلك تفتت نسيج الكالس أو أجزاء منه ويكون ذلك فى محلول مناسب وبذلك يتكون معلــق suspension بــه مجاميع من خلايا الكالس أو خلايا مفردة وعند زراعة مجاميع من هذه الخلايا علــى بيئة مناسبة فإنها تكون شبه الجنين القلبى ثم شبه الجنين الطوربيدى ثم يتكون مــن الأخير النبات الصغير plantlet (شكل ١١٤ز). ومنه يتكون النبات البالغ ومن ذلــك يتضح إنه يمكن عمل دورة الحياة لنبات الجزر بالطريقة العاديــة بزراعـــة البــذور وبزراعة الأنسجة. أنظر الأشكال بالملحق.



شكل ١١٤ز: تكوين نبات الجزر عن طريق مزارع الأنسجة (جذور). أنظر الجزء الثانى.

جدول ٩: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصـــر الصـــغرى والكـــبرى، والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقـــات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات الذرة.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	2500	1212	1900
Ammonium nitrate	165	640	1650
Calcium chloride	176	588	440
Magnesium sulphate	370	247	370
Potassium phosphate	510	136	170
Micronutrients			
Manganese sulphate	22300	11150	22300
Zinc sulphate	2870	5760	8600
Boric acid	6200	3100	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	240	250
Cobalt chloride	25	24	25
Ferrous sulphate	13900	27800	27850
Na2EDTA	18600	37300	37250
Vitamins			
Inositol	--	90	--
Thiamine-HCL	400	8500	250
Nicotinic acid	--	6000	1250
Pyridoxine-HCl	--	1000	250
Ca pantothenate	--	--	250
Amino acid and amids			
Glycine	--	2	7.5
Asparagine	--	--	2250
Glutamic acids	147	--	--
Serine	105	--	--

تابع جدول ٩:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Growth regulators			
2.4-D	15	2	--
Sucrose	20	20	20
Agar	7	--	8
pH	5.8	6	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالملليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالملليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٠ : يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات القمح.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	950	100	1900
Ammonium nitrate	825	--	1650
Calcium chloride	220	150	440
Magnesium sulphate	185	250	370
Magnesium chloride	--	300	--
Potassium phosphate	85	--	170
Sodium phosphate	--	90	--
Ammonium sulphate	--	200	--
Micronutrients			
Manganese sulphate	11150	13200	22300
Zinc sulphate	4300	3000	8600
Boric acid	3100	3000	6200
Potassium iodide	415	750	830
Copper sulphate	12.5	250	25
Sodium molybdate	12.5	250	250
Cobalt chloride	12.5	250	25
Ferrous sulphate	13925	13900	27900
Na2EDTA	18625	18600	37250
Vitamins			
Inositol	50	100	100
Thiamine-HCL	50	10000	400
Nicotinic acid	250	1000	
Pyridoxine-HCl	250	1000	
Amino acids			
Protein hydrolysate	--	--	2000

تابع جدول ١٠:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Growth regulators			
Kinetin	1	--	--
2,4-D	0.5	2	--
IAA	3.2	--	2
Sucrose	15	20	30
Agar	5	--	10
pH	5	6.2	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالملليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالملليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١١: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات الطماطم.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	2500	1900	1900
Ammonium nitrate	--	1650	1650
Calcium chloride	200	440	440
Magnesium sulphate	400	370	370
Potassium phosphate	--	170	170
Ammonium sulphate	300	--	--
Micronutrients			
Manganese sulphate	13200	22300	22300
Zinc sulphate	1000	8600	8600
Boric acid	5000	6200	6200
Potassium iodide	1000	830	830
Copper sulphate	200	25	25
Sodium molybdate	--	250	250
Cobalt chloride	100	25	25
Ferrous sulphate	1500	27850	27850
Na2EDTA	20000	37250	37250
Vitamins			
Inositol	1000	100	100
Thiamine-HCL	5000	100	10000
Nicotinic acid	5000	500	1000
Pyridoxine-HCl	500	--	1000
Amino acids			
Glycine	--	2	--
Growth regulators			
2,4-D	0.5	--	--

تابع جدول ١١:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
CPA	2	--	--
Kinetin	0.1	--	--
IAA	--	2	--
BAP	--	2.5	0.23
NAA	--	--	0.93
Sucrose	30	30	30
Agar	6	--	8
pH	5.9	5.8	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٢ : يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات البطاطس.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	1000	2500	1900
Ammonium nitrate	--	--	1650
Calcium chloride	150	150	440
Magnesium sulphate	250	250	370
Potassium chloride	300	--	--
Potassium phosphate	--	--	170
Sodium phosphate	90	150	--
Ammonium sulphate	200	134	--
Micronutrients			
Manganese sulphate	13200	13200	22300
Zinc sulphate	3000	2000	8600
Boric acid	3000	3000	6200
Potassium iodide	750	750	830
Copper sulphate	250	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	250	25	25
Ferrous sulphate	13900	--	27850
Na2EDTA	18600	28000	37250
Vitamins			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	10000	1000	500
Nicotinic acid	1000	1000	5000
Pyridoxine-HCl	1000	1000	500
Biotin	--	--	50
Folic acid	--	--	500

تابع جدول ١٢:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Amino acids			
Glycine	--	--	2
Protein hydrolysate	2000	--	1000
Growth regulators			
2,4-D	2	--	--
NAA	--	2	0.1
IAA	--	--	0.05
BAP	--	--	0.5
Sucrose	20	20	10
Agar	5	--	10
pH	5.8	5.8	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمللیجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمللیجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٣: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصـــغرى، والكـــبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقـــات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات الموالح.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	1900	1900	475
Ammonium nitrate	1650	1650	1000
Calcium chloride	440	440	110
Magnesium sulphate	370	370	92.5
Potassium phosphate	170	170	--
Sodium phosphate	--	--	300
Sodium sulphate	--	--	150
Micronutrients			
Manganese sulphate	22300	22300	11200
Zinc sulphate	8600	8600	4300
Boric acid	6200	6200	3100
Potassium iodide	830	830	420
Copper sulphate	25	25	130
Sodium molybdate	250	250	130
Cobalt chloride	25	25	130
Ferrous sulphate	27850	27850	13900
Na2EDTA	37250	37250	18600
Vitamins			
Inositol	100	100	200
Thiamine-HCL	100	10000	20
Nicotinic acid	500	5000	100
Pyridoxine-HCl	500	1000	100
Biotin	--	--	50
Folic acid	--	--	100
Riboflavin	--	--	50
Ascorbic acid	--	--	3000

تابع جدول ١٣:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Amino acids			
Glycine	2	2	--
Growth regulators			
NAA	2	--	--
BAP	--	10	--
IAA	--	--	0.25
Kinetin	--	--	0.5
Sucrose	20	50	20
Agar	6	--	7
pH	5.8	5.4	5.7

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالملليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٤: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصـــغرى، والكـــبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقـــات خلوية، ونباتات كاملة فى أشجار المانجو.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	950	950	1900
Ammonium nitrate	825	825	1650
Calcium chloride	220	220	440
Magnesium sulphate	185	185	370
Potassium phosphate	85	85	170
Micronutrients			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	13925	27850	27850
Na2EDTA	18625	37250	37250
Vitamins			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	100
Nicotinic acid	500	500	500
Pyridoxine-HCl	500	500	500
Ascorbic acid	10000	10000	--
Amino acids			
Glycine	2	2	2
Glutamine	400	400	--
Growth regulators			
2,4-D	2	--	--

تابع جدول ١٤:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
NAA	--	--	5
Kin	--	--	2.5
Sucrose	30	30	40
Agar	8	--	7
pH	5.7	5.7	5.7

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالمليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالمليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٥: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات البجونيا.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	1900	1900	1900
Ammonium nitrate	1650	1650	1650
Calcium chloride	440	440	440
Magnesium sulphate	370	370	370
Potassium phosphate	170	170	170
Micronutrients			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	27850	27850	27850
Na2EDTA	27250	37250	37250
Vitamins			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	100
Nicotinic acid	500	500	500
Pyridoxine-HCl	500	500	500
Amino acids			
Glycine	2	2	2
Growth regulators			
NAA	1	--	0.01
BAP	0.01	--	0.1

تابع جدول ١٥:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Sucrose	30	30	30
Agar	6	--	6
pH	5.8	5.8	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالملليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالملليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

جدول ١٦: يوضح محتويات بعض البيئات المغذية من العناصر الصغرى، والكبرى والفيتامينات، والأحماض الأمينية، ومنظمات النمو المستخدمة فى تكوين كالس، ومعلقات خلوية، ونباتات كاملة فى نباتات الكوردلين Cordyline تشابه فى شكلها نباتات الدراسينا.

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Macronutrients			
Potassium nitrate	1900	1900	1900
Ammonium nitrate	1650	1650	1650
Calcium chloride	440	440	440
Magnesium sulphate	370	370	370
Potassium phosphate	170	170	170
Micronutrients			
Manganese sulphate	22300	22300	22300
Zinc sulphate	8600	8600	8600
Boric acid	6200	6200	6200
Potassium iodide	830	830	830
Copper sulphate	25	25	25
Sodium molybdate	250	250	250
Cobalt chloride	25	25	25
Ferrous sulphate	27850	27850	27850
Na2EDTA	37250	37250	37250
Vitamins			
Inositol	100	100	100
Thiamine-HCL	100	100	1000
Nicotinic acid	--	500	--
Pyridoxine-HCl	--	500	--
Amino acids			
Glycine	2	2	--
Growth regulators			
2,4-D	3	--	--

تابع جدول ١٦:

Compounds In medium	Callus Initiation	Suspension Cells	Plantlet Re generation
Sucrose	20	30	20
Agar	9	--	6
pH	5.6	5.8	5.8

* أوزان العناصر الكبرى تحسب بالملليجرامات.

** أوزان العناصر الصغرى تحسب بالميكروجرامات.

*** أوزان الفيتامينات تحسب بالميكروجرامات ما عدا إينوسيتول يحسب بالملليجرامات.

**** أوزان الأحماض الأمينية تحسب بالميكروجرامات.

الباب الثامن

البلازميدات Plasmids

البلازميد Plasmids

البلازميدات عبارة عن جزيئات دنا حلقية circular زائدة الحلزنة ملتفة على بعضها supercoiled (شكل ١١٥)، موجودة فى أغلب أنواع البكتيريا وليت فى جيع السلالات. أغلب البلازميدات صغيرة الحجم حوالى ٠,٢ إلى ٤% من حجم الكروموسوم البكتيرى (جدول ١٧).

فى أغلب حالات النمو فإن البلازميدات غير ضرورية للخلايا العائلة لها. كثير من البلازميدات، على أى حال، تحتوى جينات لها قيمة أو تأثير فى بيئات خاصة أى لها تأثير فى حالات وظروف خاصة معينة. عادة تكون هذه الجينات هى الدليل الرئيسى على وجود البلازميد. مثال لذلك، أن بعض البلازميدات R تجعل الخلايا البكتيرية الحاملة لها مقاومة لبعض المضادات الحيوية، ولذلك فى الطبيعة فإن الخلية التى تحتوى على هذا البلازميد تعيش أفضل فى البيئات الموجودة بها مضادات حيوية.

فى كثير من أنواع البكتيريا تكون البلازميدات مسئولة عن نقل الجينات بين الخلايا بطريقة معينة خاصة. هذه الخاصية سببت بداية الإهتمام بالبلازميدات فى الخمسينيات. تماثل البلازميدات الفاجات فى صفة معينة فى أنها معتمدة أو بشدة على نواتج التحول الغذائى فى خلية العائل أى البكتيريا لكى تتكاثر. تستخدم البلازميدات طبيعياً أغلب آليات التكاثر أى التضاعف فى العدد replication machinary الخاصة بخلية العائل وهى بذلك موديلات نافعة للتعرف ولفهم آلية حدوث التكاثر فى دنا خلية البكتيريا.

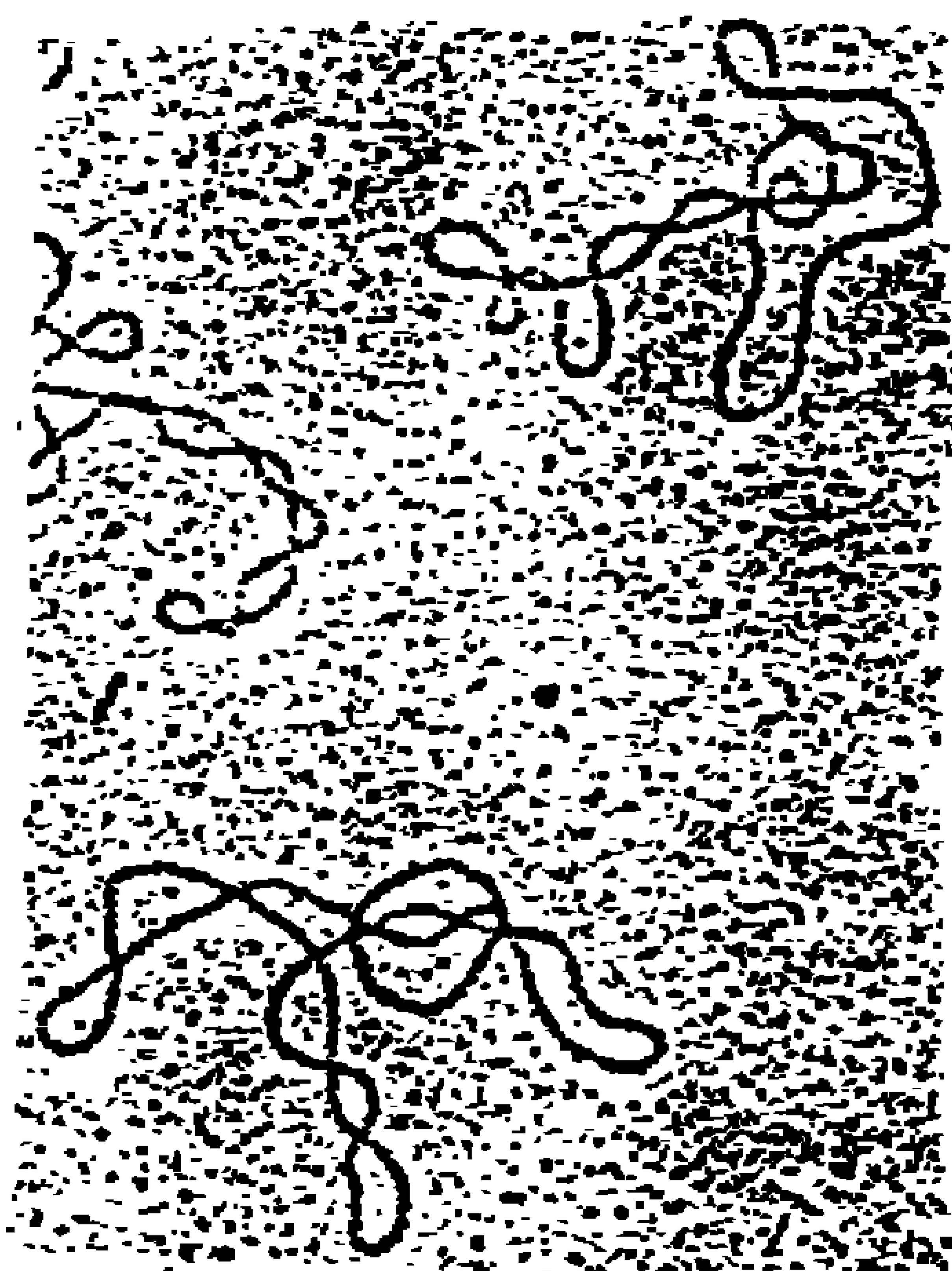
وبالإضافة إلى ذلك فهى هامة جداً لباحثى وعلماء وراثة الميكروبات microbial geneticists وذلك لتكوين وتركيب وعمل الحالات ثنائية الأساس الكروموسومى الجزئية partial diploids فى الخلايا البكتيرية، وبالإضافة إلى ذلك فهى هامة جداً فى الهندسة الوراثية لأنها تستخدم بكثرة كناقل وسيط للجينات المطلوب توطينها

gene-cloning vehicles. وهى تستخدم لذلك بكثرة فى كثير من أبحـاث البيولوجيا الجزيئية molecular biology والوراثة الجزيئية molecular genetics.

جدول ١٧: أمثلة لبعض البلازميدات وخواصها.

البلازميد	الحجم (Kb)	عدد النسخ لكل كروموسوم	الإنتقال الذاتـى	خواص البلازميدات وتأثيرها على الشكل الظاهرى
بلازميدات				
البلازميد ColE2	٦٤	١٠-١٥	لا	يفسد تدرج الطاقة energy gradient يسبب مناعة العائل لكوليسين E1
البلازميد ColE2	٧,٦	١٠-١٥	لا	عبارة عن Dnase، يسبب مناعة العائل لكوليسين E2
البلازميد ColE3	٧,٦	١٠-١٥	لا	عبارة عن Rnase ريبوسومى، يسبب مناعة العائل لكوليسين E3
بلازميد F	٩٤,٥	١-٢	نعم	تكوين الهديب F أو الهدبيات F أى F pilus –F لها دور في حدوث التزاوج
بلازميدات R				
R100	١٠٦,٧	١-٢	نعم	تجعل العائل مقاوم للمضادات الحيوية تترامسين Tetr والستربتوميسين Strr، Camr، Sulr
RK2	٥٦	٥-٨	نعم	مدى عوائلى واسع
pSC101	٩	أقل من ٥	لا	عدد النسخ منخفض، توافق مع طرز البلازميدات ColE1 و Tetr
بلازميد الفاج				
dy λ	٦,٤	٥٠	لا	جينات لامدا cro, cl, O, P λ genes cro, cl, O, P
بلازميدات معاد صياغتها (هجين) recombinant				
pBR322	٤,٤	٢٠	لا	عدد من النسخ متوسط، تضاعف وتكرار طراز ColE1، Ampr
pUC 18	٢,٧	٢٠٠-٥٠٠	لا	عدد كبير من النسخ تضاعف وتكرار طراز ColE1 مع وجود طفرة تزيد من عدد النسخ Ampr
pACYC 184	٤	١٠-١٢	لا	تجعل العائل مقاوم للمضادين تتراميسين Tetr و Camr

Plasmid	Size (kb)	Number of copies per chromosome	Self-transmissible	Phenotypic features
Col plasmids				
ColE1	6.4	10-15	No	Colicin E1 disrupts energy gradient, host immunity to Colicin E1
ColE2	7.6	10-15	No	Colicin E2 is a Dnase, host immunity to Colicin E2
ColE3	7.6	10-15	No	Colicin E3 is a ribosomal, host immunity to Colicin E3
F plasmid	94.5	1-2	Yes	F-pllus, conjugation
R plasmids				
R 100	106.7	1-2	Yes	Cam^r Str^r Sul^r Tet^r
RK2	56.0	5-8	Yes	Broad host range
pSC 101	9.0	< 5	No	Low copy number, compatible with ColE1-type plasmids, Tet^r
phage plasmid				
λ dv	6.4	50	No	Genes cro, cI, o, p
Recombinant *plasmids*				
pBR322	4.4	20	No	Medium copy number, ColE1-type replication, Amp^r
pUC18	2.7	200-500	No	High copy number, ColE1-type replication with a mutation that increase the copy number, Amp^r
pACYC184	4.0	10-12	No	Cam^{r}Tet^r



شكل ١١٥ : جزيئين من دنا زائدين الحلزنة ملتفين supercoiled (بلازميدين)

أنــواع البلازميـــــدات

Types of Plasmids

يختص هذا الجزء بأنواع البلازميدات وخاصة بلازميدات البكتيريا *E. coli* أمكن إثبات وجود عديد من طرز أو أنواع البلازميدات فى عديد من سلالات البكتيريا *E. coli* (جدول ١٧)، ولكن الكم الأكبر من المعلومات تم التعرف عليه من ثلاث طرز أو أنواع رئيسية تقريباً وهى البلازميدات Col, R, F والتى تشترك فى بعض الخواص ولكن غالباً ما تكون مختلفة تماماً فى أغلب الخواص. وجود هذه البلازميدات فى الخلية يتم التعرف عليه أساساً بما يأتى من الخواص:

١ – بلازميدات F أى بلازميدات الخصوبة أى بلازميدات الجنس

F, the fertility or sex plasmids

هذه البلازميدات وسيطة حيث أنها تتوسط القابلية فى نقل جينات الكروموسوم أى أنها تساعد فى نقل جينات الكروموسوممن خلية بكتيرية تحتوى بلازميد F إلى خلية خالية منه. يمكن أن ينتقل بلازميد F نفسه إلى خلية بكتيرية خالية منه.

٢ – بلازميدات R وهى بلازميدات مقاومة للعقاقير

Rplasmids, the drug resistance plasmids

هذه البلازميدات تجعل خلايا العائل أى البكتيريا مقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية. كثير من البلازميدات R يمكنها أن تنقل المقاومة إلى الخلايا الخالية من R.

٣ – بلازميدات Col وهى بلازميدات منتجة الكوليسينز

Col plasmids, the colicinogenic plasmids

تخلق البلازميدات Col البروتينات، وتعرف هذه البروتينات فى مجموعها بإسم colicins، وهى يمكنها أن تقتل السلالات البكتيرية المقاربة لبعضها فى النسب

closely related أى نفس الطراز of the same type والتى ينقصها البلازميد Col.
آلية القتل تختلف بإختلاف طرز أو أنواع البلازميدات Col.

التعرف على وجود البلازميدات
Detection of plasmids

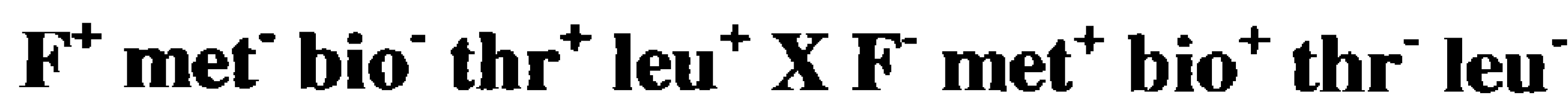
يمكن التعرف على وجود البلازميدات بواسطة كل من التجارب الوراثية والفيزيائية genetic and physical experiments. أول بلازميد إكتشف هو البلازميد F سلالة A من البكتيريا E. coli لها الشكل الظاهرى $Met^- Bio^- Thr^+$ Leu^+ تم خلطها مع سلالة ثانية B لها شكل ظاهرى عكس السابقة $Met^+ Bio^+$ $Thr^- Leu^-$ ثم تم خلط السلالتين وزراعة الخليط على بيئة الحد الأدنى. تم تكوين مستعمرات على بيئة الحد الأدنى لها الشكل الظاهرى $Met^+ Bio^+ Thr^+ Leu^+$ وتعتبر هذه المستعمرات هجين بين السلالتين. تسمى حالة الهجين هنا فى البكتيريا بإسم recombinants ويكون تكرارها بدرجة $١٠^{-٧}$. عند معاملة السلالة A بالإستربتوميسين ثم غسلها بالماء لتخليصها من المضاد الحيوى قبل خلط السلالتين فإن المستعمرات الهجين يستمر تكوينها. لو أن السلالة B عوملت أولاً بالإستربتوميسين لا يتكون أفراد هجين أى أفراد معاد صياغتها أى recombinant.

هذه التجربة توضح أن الهجن recombinant أى المعاد صياغتها تشتق من السلالة B وأن خلط السلالتين مع بعضهما ينشأ عنه نقل المعلومة الوراثية بطريقة واحدة one-way transfer of genetic information وفى تجربة أخرى تستخدم فيها سلالة ثالثة وهى السلالة C والتى لا يمكنها نقل أى معلومة وراثية للسلالة B. لو أن السلالة C خلطت مع السلالة A وسمح لهما بالنمو مختلطين لمدة طويلة ثم تم عزل المستعمرات C. هذه المستعمرات C الجديدة ويرمز لها C´ يمكنها نقل الجينات للسلالة B. ترجمة هذه النتائج هى أن السلالة A تحتوى على عنصر خصوبة أى عامل خصوبة a fertility element والذى يسمى F

والذى يتوسط نقل الجينات الكروموسومية من البكتيريا A إلى البكتيريا B. ينقص السلالة C العامل F.

عند نمو السلالات C, A مع بعضهما فإن F تم نقله من السلالة A إلى السلالة C مكوناً السلالة C´ وهذه يمكنها نقل المعلومات الوراثية أى جزء من دنا ويمكن أن يطلق على هذا الجزء من دنا المعلمات الوراثية أو الدلالات الوراثية إلى السلالة B.

وهكذا كان التهجين فى أول خطوة يمثل بالآتى:



F^{+} met^{-} bio^{-} thr^{+} leu^{+} X F^{-} met^{+} bio^{+} thr^{-} leu^{-}

وحيث أن عملية نقل F تكون فى طريق واحدة one-way nature of transfer فإن الخلية المحتوية على F تعتبر واهبة donor وتعتبر ذكر male والخلية الخالية من F تعتبر مستقبلة recipient وتعتبر أنثى female.

تسمى الأنواع المختلفة من F بإسم variants F ويرمز لها بـــ F شرطة F´ تم دراستها بتفصيل كبير وهى تحمل أوبيرون Lac (operon lac) وقد إستعمل فى تكوين أى تركيب خلايا ثنائية جزئياً partial diploids. يسمى هذا بإسم F´ *lac*. أما عن كيفية نقل F´ *lac* وذلك بإستخدام بيئة الحد الأدنى مضاف إليها لاكتوز ومضاد حيوى مثل ستربتوميسين وصبها فى أطباق بترى ويتم تنمية خليط من سلالتين بكتيريتين على هذه البيئة أحدهما سلالة واهبة حساسة للإستربتوميسين وسلالة أخرى مستقبلة مقاوة للإستربتوميسين.

ولذلك فى هذه الحالة يكون التهجين كما يلى:



F´ lac^{+} / Lac^{-} Str^{s} X Lac^{-} Str^{r}

وفى التهجين السابق تكون الخلايا الواهبة حاملة المعلم أو الدلالة lac^{+} (lac^{+} marker) على البلازميد والمعلم أو الدلالة lac^{-} على الكروموسوم (لاحظ إستعمال

الشرطة المائلة فى المثال (/) للتمييز بين لمعلمات البلازميدية والمعلمات أى الدلالات الكروموسومية).

زراعة مخلوط السلالتين على بيئة آجار الحد الأدنى لاكتوز minimal-lactose agar المضاف إليها ستربتوميسين ينتج عنهما سلالة هجين recombinant أى سلالة معاد صياغتها ويكون تركيبها F' lac+/lac- Strr. تكون المقارنة control هنا عبارة عن أطباق بها السلالة الواهبة فقط وتكون النتيجة عدم نمو هذه السلالة فى الأطباق، حيث جميع الخلايا حساسة للإستربتوميسين. تكون المقارنة الثانية بأطباق بها السلالة المستقبلة فقط وتكون النتيجة عدم نمو هذه السلالة فى الأطباق حيث أن جميع الخلايا تركيبها lac^- لاحظ أن وظيفة معلم أو دلالة الإستربتوميسين streptomycin marker هى منع نمو الخلايا الواهبة وهذا المعلم يسمى بالإنتخاب المضاد counterselection marker أو بمعلم أو دلالة الإنتخاب المضاد conterselective marker. تستخدم عادة مقاومة المضاد الحيوى لغرض الإنتخاب المضاد، ولكن يمكن إستخدام أشكال ظاهرية أخرى other phenotypes فى هذا الغرض. ومثال لذلك نقل F´.

يمكن التعرف عليه بالتهجين بين سلالتين كما يأتى:



F´ lac^+ / met^- X *lac*$^-$ met^+

وزراعة هاتين السلالتين المختلطتين على أطباق بترى فيها بيئة الحد الأدنى لاكتوز. السلالة الواهبة لن تكون مستعمرات لأن البيئة خالية من الميثيونين (غياب الميثيونين فى الإنتخاب المضاد) والسلالة المستقبلة التى ينقصها F´ *lac*$^+$ لن تنمو ولن تكون مستعمرات لأنها تحتوى lac^- وهى بذلك تكون غير قادرة على إستخدام اللاكتوز كمصدر للكربون، وفى هذه الحالة يكون المعلم المختار selected marker هو *lac*$^+$. ولكن الخلايا الهجين أى recombinant أى المعاد صياغتها هى الوحيدة التى ستنمو وسيكون تركيبها F´ *lac*$^+$/*lac*$^-$ met^+ ولأنها

تحتوى العوامل الوراثية الخاصة بتخليق الميثيونين ذاتياً والخاصة بالقدرة على إستخدام سكر اللاكتوز كمصدر للكربون.

مرة أخرى نعود للتجربة الأولى أى التهجين بين السلالة A والسلالة B والتى يستخدم فيها F. وجد أن السلالات ´F الناتجة تظهر إختلافات كمية جوهرية مؤكدة. عند خلط السلالتين قبل الزراعة بنصف ساعة فإن الهجن أى الخلايا المعاد صياغتها recombinant تنشأ بتعداد $١٠^{-٧}$ لكل خلية واهبة فى تجربة الهجين بين BXA وحوالى ٥٠% فى تجربة *F´ lac*. الإختلاف هنا فى أن فى التجربة *F´ lac* هى أن البلازميد يحمل المعلم الوراثى أو الدلالة الوراثية genetic marker بينما هذه المعلمات أو الدلالات الوراثية فى التجربة BXA تكون كروموسومية. وهكذا فى التجربة BXA بالرغم من أن حوالى نصف الخلايا المستقبلة تستقبل نسخة من F فإن جزء بسيط جداً منها يستقبل المعلمات أو الدلالات الكروموسومية. هذه الحالة من الإنتقال للكروموسوم rare chromosomal mobilization نادرة الحدوث ولكنها ثابتة فى البكتيريا.

كيفية إنتقال البلازميد Plasmid transfer:

تم عمل التهجين بين سلالتين من البكتيريا كما يأتى:



$F' \, lac^{+} / lac^{-} \, Str^{s} \, tsx^{r} \times F' \, lac^{-} \, Str^{r} \, tsx^{s}$

معنى tsx^{r} أن خلية البكتيريا ليس لها القدرة على إمتصاص الفاج T6. بعد فترة من خلط السلالتين مع بعضهما فإن جزء من هذا المخلوط تم زراعته فى أطباق بترى محتوية بيئة الحد الأدنى لاكتوز وبها دليل ملون وبها ستربتوميسين، وجد أن ٩٠% من المستعمرات كانت lac^{+}.

وهكذا إن أغلب الخلايا الواهبة نقلت $F' \, lac^{+}$. لتحديد هل الخلايا الواهبة التى وهبت $F' \, lac^{+}$ للخلايا المستقبلة لازالت محتفظة بنسخة من البلازميد أو فقدت

البلازميد تماماً نتيجة لإنتقاله للخلايا الواهبة. فإنه يتم أخذ جزء من مخلوط التزاوج mating mixture ثم يتم معاملتها بكمية زائدة من فاج T6. فقد وجد درجة عالية جداً من إصابة خلايا البكتيريا بالفاج وهى خلايا السلالة المستقبلة الحساسة للفاج قد تحللت فى ظروف دقائق نتيجة لتأثير بسيط وهو أن آلاف جزيئات الفاج قد أحدثت ثقوب فى جدار الخلية البكتيرية. الخلايا الحية المتبقية والتى تكون مقاومة للفاج تم نقلها لبيئة الحد الأدنى لاكتوز ودليل وبدون ستربتوميسين فقد تكونت مستعمرات بكثرة. معنى ذلك أن الخلايا الواهبة لازالت تحتفظ بنسخة من البلازميد.

ومن تجارب أخرى كثيرة أمكن إستنتاج أن غالبية خلايا السلالة الواهبة تحتوى على نسخة واحدة فقط من $F'\ lac^+$. وهكذا فإن الخلايا التى قامت بنقل البلازميد لازالت محتفظة بنسخة من البلازميد، وذلك يعنى أن قبل النقل مباشرة أو أثناء النقل يحدث تضاعف لدنا البلازميد بحيث نسخة تنتقل للخلية المستقبلية ونسخة تبقى فى الخلية الواهبة وهكذا يتكرر ذلك. وقد أمكن إثبات ذلك بتجارب إضافية أخرى حيث أن الخلايا المعاد صياغتها تبقى قادرة بإستمرار على نقل المعلم lac^+.

كيفية الإستدلال على وجود البلازميد إذا لم يكن له تأثير ظاهرى بسيط

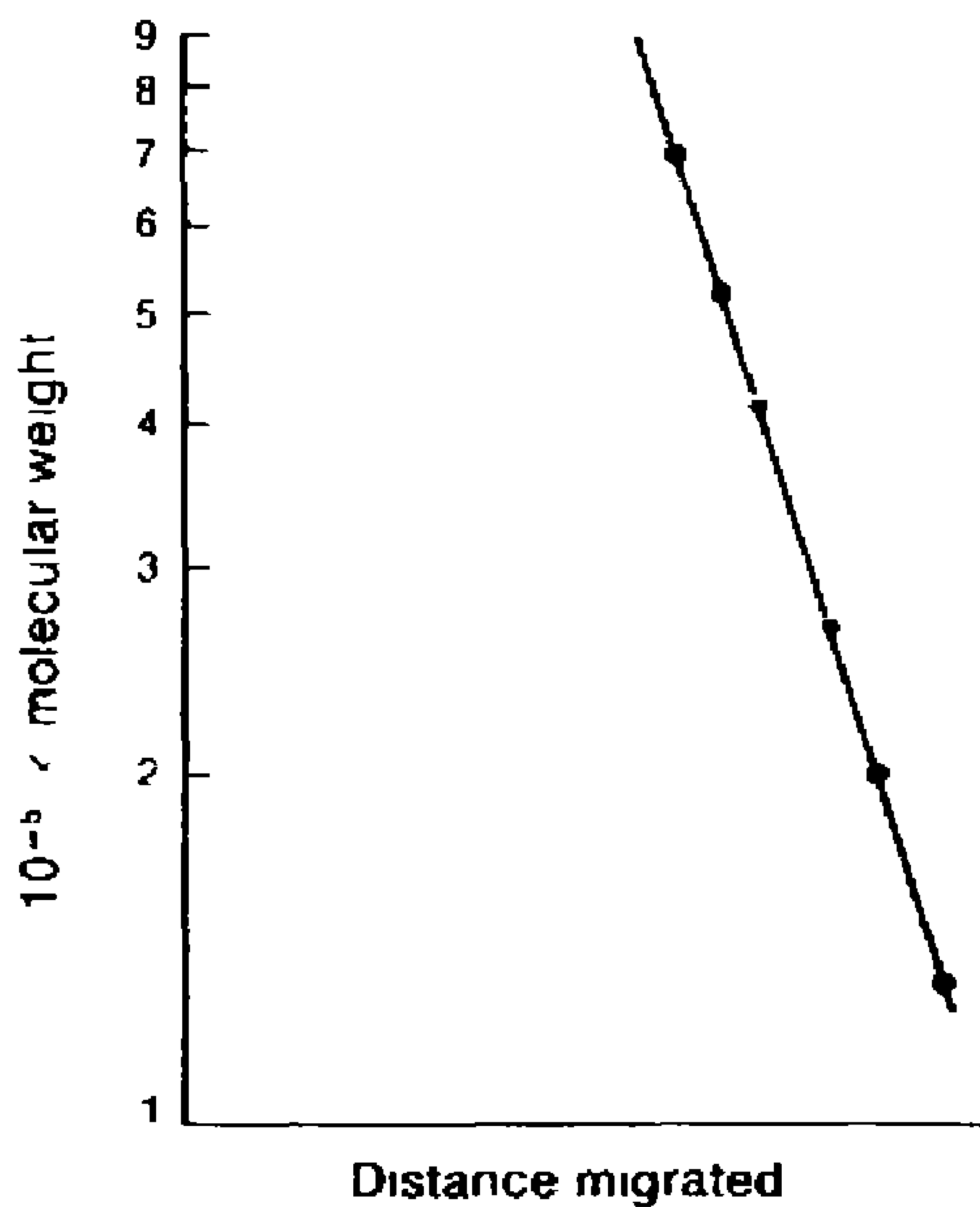
How you can detect a plasmid if it does not have simple genetic phenotypes?

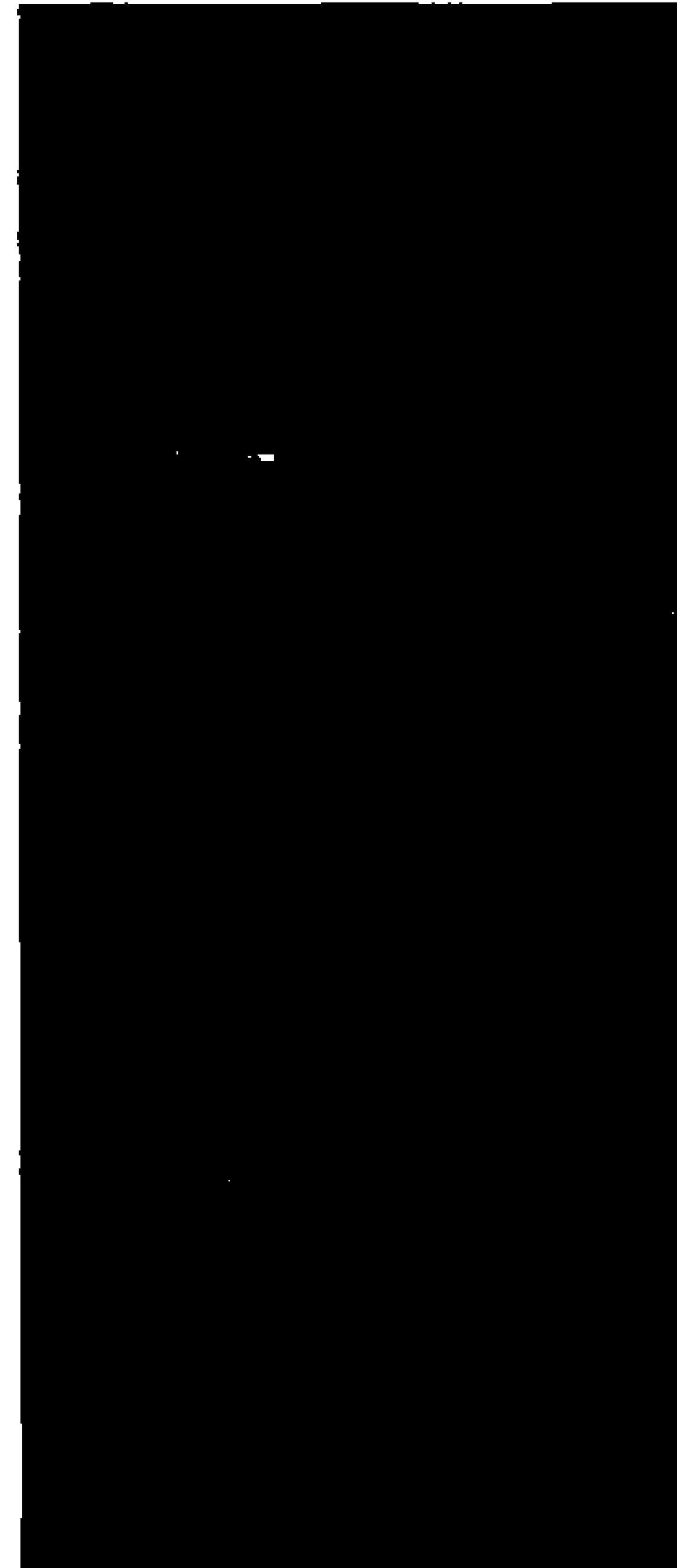
يتم أخذ مستعمرة واحدة من الطبق ثم يتم تحليل الخلايا البكتيرية برقة gently ويتم فصل وتنقية دنا بواسطة طريقة agarose gel electrophoresis.

حيث أن الكروموسوم البكتيرى لا يمكنه تخلل الأجاروز والعكس صحيح فى البلازميد فإنه صغير ويهاجر فى الأجاروز. عند وجود البلازميد فإنه يكون شريط ضيق (حزمة ضيقة) فى الجل gel فى موقع مميز لوزنه الجزيئى.

يمكن الكشف عن الحزمة band بصبغها أولاً لكى يمكن رؤيتها وذلك بصبغ الجل ببروميد الإيثيديم. حيث أن بروميد الإيثيديم يلتصق بشدة بجزىء دنا وعند تعريض ذلك للأشعة فوق البنفسجية فإنه تحدث فلورة لدنا البلازميد نتيجة فلورة بروميد الإيثيديم ويمكن رؤيته بالعين المجردة (شكل ١١٦).

وبحساب المسافة أى مسافة هجرة جزء دنا فى زمن معين يمكن التعرف على الوزن الجزيئى لدنا البلازميد وذلك بمقارنته بمسافة هجرة جزء دنا بلازميد معروف وزنه الجزيئى (شكل ١١٦) وفى نفس الزمن.





شكل ١١٦: (١) هجرة دنا خمسة أنواع من البلازميدات من القاعدة إلى القمة فى جل الأجاروز. كل دنا بلازميد ملتصق بشدة مع جزيئات بروميد الإيثيديم التى تتفلور ويمكـــن رؤيتها. كل جزىء دنا فى حارة lane، (٢) حساب الوزن الجزيئى لدنا البلازميـــد مـــن منحنى قياس.

تنقية دنا البلازميد

Purification of Plasmid DNA

يمكن تنقية دنا البلازميد من البكتيريا بطريقة معينة يمكن تلخيصها كما يلى. يمكن كسر الخلايا البكتيرية برقة gently opened بواسطة معاملتها بمنظف detergent. المحلول الناتج يسمى cell lysate ويكون شبه شفاف يتم تعريضه للطرد المركزى. يرسب الكروموسوم البكتيرى الكبير المندمج فى قاع أنبوبة الطرد المركزى وهو يتكون من دنا ورنا بروتين فى حين أن دنا البلازميد صغير الحجم يبقى معلق فى supernatant ويسمى بالرائق cleared lysate.

بعض أجزاء من دنا الكروموسوم يمكن أن يوجد فى cleared lysate ولكن حيث أن بلازميد دنا حلقى covalently circular فإنه يمكن فصل أجزاء دنا الكروموسوم الملونة بهذا cleared lysate بواسطة طرق عديدة. يمكن أيضاً فصل البلازميدات المقطوعة التى أصبحت غير حلقية not covlantly circular بطرق عديدة.

إنتقال البلازميد دنا

Transfer of Plasmid DNA

بداية التعرف على وجود البلازميدات F، ´F عن طريق قدرتها على الإنتقال من خلية واهبة إلى خلية مستقبلة. كيف يتم إنتقال دنا.

خطوات فى عملية الإنتقال Stages in transfer process:

وضحت أحد الإكتشافات المبكرة عن الإرتباط recombination بين خلايا واهبة وخلايا مستقبلة أنها تحتاج إلى تلامس مع خلية أخرى. هذه أمكن إثباتها بواسطة تجارب عن مزارع F^- ومزارع F^+ المفصولة بغشاء أو مرشح مسامى porous filter. لا تتكون الخلايا الهجين أى المعاد صياغتها أى recombinant

عند منع تلامس خلية مع أخرى أى لابد من حدوث عملية التلامس ولذلك فقد إستنتج أن حدوث تكوين الخلايا المعاد صياغتها أى الهجين أى recombinant لا يحدث بسهولة، أى نتيجة حركة المادة الوراثية خلال بيئة النمو، بل أكثر تعقيداً من ذلك. وقد دعى ذلك إلى إستخدام لفظ التزاوج البكتيرى bacterial conjugation or mating.

بعد ذلك بعد سنوات، تم الحصول على صورة رائعة بالمجهر الإلكترونى عند تزاوج البكتيريا. أوضحت عديد من التجارب أن نقل البلازميد يمكن أن يضيف إلى أربعة مراحل وهى:

١ - تكوين أزواج من الخلايا متخصصة أى كل زوج يشمل خلية واهبة وخلية مستقبلة يكون كل خلية واهبة ملامسة تماماً لخلية مستقبلة يسمى ذلك بالتلامس الفعال effective contact.

٢ - إعداد لإنتقال دنا DNA mobilization.

٣ - إنتقال دنا DNA transfer.

٤ - تكوين بلازميد نشط فعال قابل للتضاعف أى التكرار فى الخلية المستقبلة.

عند تلامس خلايا محتوية على F أو F′ مع خلية مستقبلة فإن الأربعة خطوات يتم حدوثها بالتتابع السابق. كثير من أنواع البلازميدات على أى حال غير قادرة وراثياً على القيام بجميع هذه الخطوات. يمكن تبعاً لذلك تصنيف البلازميدات إلى أربعة مجاميع ويتوقف ذلك على هذه الخواص وهى:

١ - بلازميدات غير قابلة للإنتقال non-transmissible plasmids وهى بلازميدات ينقصها الجينات الخاصة بالتلامس الفعال وإنتقال دنا.

٢ - بلازميدات التزاوج conjugative plasmids وهى بلازميدات تحمل جينات خاصة بحدوث التلامس الفعال.

٣ – بلازميدات متحركة mobilized plasmids وهى بلازميدات قادرة على تخليق دنا اللازم لعملية الإنتقال.

٤ – بلازميدات ذاتية الإنتقال self-transmissible plasmids وهى مثل بلازميد F وحيث تكون قادرة على الإنتقال وأيضاً قادرة على التزاوج.

حدوث الإنتقال لحدوث التزاوج فى كثير من الحالات لا يكون خاص ببلازميد معين، ولذلك فإن بلازميد واحد يمكنه أن يساعد فى نقل بلازميد ثان. مثال ذلك أن خلية منفردة تحتوى كل من البلازميد F والبلازميد ColE1. يتميز البلازميد F بأنه متحرك ومتزاوج أن له هاتين الصفتين ولذلك فهو ذاتى الإنتقال. بلازميد ColE1 متنقل ولكنه غير متزاوج. ولذلك فإن خلية تحتوى على ColE1 فقط لا يمكنه نقل البلازميد. فى خلية تحتوى على كلا البلازميدين فإن F يمكن أن يعوض التزاوج الفعال المفقود والخاص بالبلازميد ColE1، ولذلك فإن ColE1 تبعاً لذلك يمكن أن ينتقل إلى خلية مستقبلة ينقصها البلازميدين.

هذه الطريقة والتى فيها البلازميد الغير متزاوج يتم نقله عن طريق التلامس الفعال والذى يتم حدوثه بواسطة بلازميد متزاوج تسمى بالهبة أو العطاء donation، والعلامة المميزة لذلك هو النقل الفعال للبلازميد الغير متزاوج بنسبة ١٠ إلى ١٠٠% الأكثر من ذلك أن عملية الإنتقال خاصة بالبلازميد ذاتى الإنتقال ولذلك فإن هذا البلازميد المنتقل ذاتياً لا يمكن البلازميد الغير منتقل من الإنتقال بواسطة تكامل بينهما بطريقة سهلة أو بسيطة simple complementation، ولكن بالرغم من ذلك يمكن أن يحدث الإنتقال فى بعض الحالات ولكن بدرجة منخفضة جداً.

أى أن الإنتقال فى هذه الحالة للبلازميد الغير منتقل بواسطة تكامل غاية فى التعقيد. أولاً لكى يحدث ذلك لابد أن يحدث توافق وإرتباط بين البلازميدين recombination ليتكون جزيىء دنا واحد يكون قابل للإنتقال single transferable

DNA molecule. ولذلك فإن البلازميد المنتقل ذاتياً يحمل معه البلازميد الغير منتقل وتسمى هذه العملية بالحمل أو بالتوصيل conduction وهى عكس الهبة أو العطاء donation، ومن هنا تكرارية حدوث نقل البلازميد الغير متزاوج هى التى تحدد هل العملية هبة أو توصيل فى حالة الهبة تكون نسبة البلازميدات المنتقلة كبيرة جداً نسبياً بالمقارنة بنسبة البلازميدات المنتقلة فى حالة التوصيل.

فى حالة توسط F فى نقل الكروموسوم فإن الكروموسوم ينتقل بالحمل أى التوصيل، ولذلك يحدث توافق وإرتباط genetic recombination بين تتابعات نيوكليوتيدات فى F وفى الكروموسوم وهكذا يحمل F الكروموسوم إلى الخلية المستقبلة. الإنتقال للكروموسوم بواسطة الحمل والذى يحدث بتكرارية منخفضة جداً، أى يحدث بتكرارية أقل بدرجة $١٠^{٧}$ مرات نقص عنه فى حالة تكرارية حدوث نقل المعلم أو الدليل أو الدالة *lac*$^{+}$ من الخلية الحاوية له ذات التركيب F´ *lac*$^{+}$ إلى الخلية المستقبلة. أى معنى ذلك أن درجة وتكرارية نقل الجين الكروموسومى أقل بكثير جداً من درجة تكرارية نقل الجين البلازميدى.

التلامس الفعال والهديبيات

Effective Contact and Pili

الخطوة الأولى فى التلامس الفعال أى التلامس لنقل الصفات الوراثية هوو الإزدواج pair formation أى توافق الخلايا فى أزواج كل زوج يشمل خلية واهبة وخلية مستقبلة، تحتاج هذه الحالة إلى زائدة تشبه بروتينية تسمى هديب جنسى sex pilus توجد على الخلية الواهبة (شكل ١١٧). الخلية المحتوية على F تسمى الهديبيات الجنسية بإسم الهديبيات F أى Fpili والخلايا المحتوية على R تسمى الهديبيات R أى R pili. فى المتوسط يوجد ١,٤-٢,٧ هديبيات F لكل خلية ويتوقف ذلك على الظروف البيئية للنمو البكتيريا.

يتم تنقية الهديب F يتكون الهديب من تركيب أنبوبى مجوف يتكون من بروتين واحد فقط كاره للماء يسمى بيلين pilin. من نتائج التجارب إتضح أن الهديب F ضرورى للتزاوج. ومن هذه التجارب ما يأتى:

١ - وجد طفرات فى البلازميد غير قادرة على تخليق الطراز البرى من البيلين وبالتالى فإنها غير قادرة على نقل البلازميد.

٢ - يمكن إزالة الهدبيبات من الخلايا بواسطة الرج القوى للمزارع. يمكن أن تتكون هديبيات على الخلايا مرة أخرى فى خلال نصف ساعة. لا يمكن للبلازميدات أن تنتقل من الخلايا فى الفترة التى تكون فيها الخلايا البكتيرية خالية من الهديبيات.

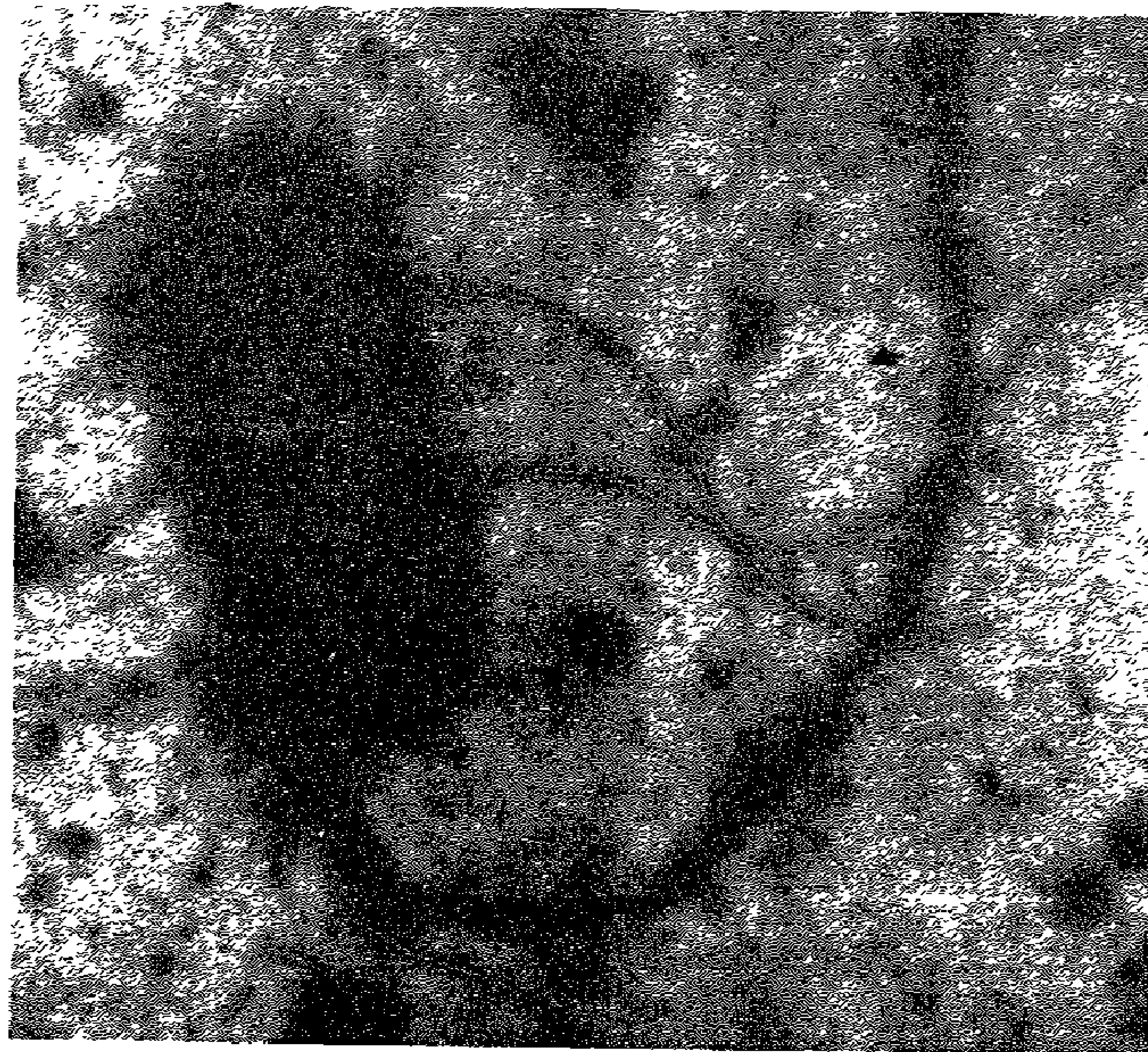
٣ - الهديبيات النقية يمكن أن تلتصق بالخلية المستقبلة.

٤ - عديد من الفاجات يمكن أن تلتصق بالهديبيات F وتسمى أحياناً تبعاً لذلك هذه الفاجات بإسم الفاجات الذكرية التخصص male-specific phage. هذه الفاجات نوعين أحدهما يلتصق بقمة الهديب والنوع الآخر يلتصق بالساق. النوع الملتصق بقمة الهديب يمنع ويثبط عملية الإزدواج للخلايا وإنتقال البلازميدات وفى النوع الثانى أى الفاجات الخاصة بالساق فإنها لا تتدخل بطريقة رئيسية فى نقل F. أى ليس لها دور رئيسى فى عملية نقل F.

وحيث أن الهديب أنبوبة مجوفة فإنه يعتقد أن دنا البلازميد ينتقل خلال تجويف الهديب. عامة لا توجد تجربة أثبتت وجود دنا داخل الهديب فى التجويف. فى تجارب أخرى أمكن إثبات الهديبيات يمكن أن تنكمش فى إتجاه الخلية الواهبة بعد الإزدواج. وهكذا يبدو أن الهديب يجعل الخلية الواهبة والخلية المستقبلة على إتصال حيث يصل بينهما ثم يقوم بجذب الخليتين لبعضهما ليصبحا ملتصقتين بشدة. طبيعة وشكل وتركيب أنبوبة التزاوج الحقيقية بين الخليتين غير واضحة.

ليست جميع الأنظمة المتقابلة المتزاوجة **mating systems** فى سلالات البكتيريا تعتمد على الهدبيبات. مثال ذلك بعض سلالات البكتيريا ***Streptococcus faecalis*** تحمل بلازميد قابل للإنتقال ذاتياً أى بلازميد تزاوج. الخلايا المستقبلة الخالية من البلازميد تنتج بروتين خاص بالتزاوج **mating protein** (يشابه أو يماثل الفيرومونات **phermones** فى الحشرات المؤنية) ولا تنتج الخلايا الواهبة أى المحتوية على البلازميد هذا البروتين.

يسبب الفيرمون أى البروتين الخاص بالتزاوج تخليق بروتين فى الخلايا الواهبة يسمى أدهسين **adhesin** والذى يغلف الخلايا الواهبة ويسبب حدوث إلتصاق وإزدواج بين الخلايا الواهبة والخلايا المستقبلة. بعد إنتقال البلازميد من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلة فإن تخليق الفيرمـــون فى هذه الخلية يتوقف.



شكل ١١٧: صورة بالجهر الإلكترونى لخلية بكتيريا إ. كولاى لها هديب واحد غـــامق اللون سميك نسبياً وخمسة أسواط رفيعة براقة.

الحركة والإنتقال للبلازميد

Mobilization and Transfer of Plasmids

يبدأ الإنتقال للبلازميد والذى يشفر تخليق بروتين معين plasmid-encoded protein. يعتقد أن هذا البروتين المعين والذى يسمى بروتين قطع nicking protein يقوم بعمل قطع مفرد لحلزون واحد فقط من حلزونى البلازميد single-strand break عند تتابع قواعد معين مميز يسمى هذا التتابع بإسم منشأ الإنتقال أو النقل transfer origin أو *ori* T. هذا القطع يسبب حوث بداية تضاعف أى تكرار الحلقة المكرورة أى التى تكر (مأخوذة من مكر) rolling circular replication أى بداية تكرار وكر الحلقة. والفرع الشريطى الحر الناتج من كر الحلقة يتم إنتقاله. يعتقد أن بروتين القطع يبقى ملتصق بالنهاية ´5، هذا النوع من الكر والتضاعف يشابه آلية كر وتضاعف الحلقة rolling-circle mechanism التى تحدث فى الفاج ϕX174. آلية تتابع خطوات إنتقال البلازميد تحدث فى خطوات عديدة (شكل ١١٨). يمكن أن تسمى آلية الإنتقال هذه بإسم looped rolling-circle mechanism ينتقل الفرع الشريطى الحر الناتج من الكر وملتصق به فى قمته بروتين القطع إلى الخلية المستقبلة ثم يحدث إنتقال تام لهذا الفرع إلى الخلية المستقبلة ويتكون منه حلقة مفردة من دنا فى الخلية المستقبلة. ثم يتم تكوين حلقة أخرى من دنا مكملة للحلقة الأولى وهكذا يصبح البلازميد عادى ثنائى الحلزون.

وفى هذه الأثناء تتكون حلقة أخرى مكملة للحلقة الأولى فى الخلية الواهبة وهكذا يصبح البلازميد فى الخلية الواهبة ثنائى الحلزون. ثم يحدث للبلازميد فى كلا الخليتين حلزنة زائدة supercoiling لاحظ من الشكل السابق حدوث تخليق دنا أى الحلزون المكمل فى كل من الخلايا الواهبة والخلايا المستقبلة، وفى حالة التخليق فى الخلية الواهبة يسمى donor conjugal DNA synthesis وفى حالة التخليق فى الخلية المستقبلة يسمى recipient conjugal DNA synthesis. يلاحظ

فى الخلايا الواهبة أثناء إنتقال دنا أى الفرع يحدث فى نفس الوقت تخليق حلقة دنا جديدة مكملة.

ولكن عملية تخليق دنا لتكوين حلقة مكملة لحدوث التضاعف فى بلازميد الخلية الواهبة ليست له أى علاقة بالقوى المحركة motive force اللازمة لنقل فرع البلازميد بالرغم من أن العمليتين تحدثان فى آن واحد، وفيما يلى ما يثبت ذلك:

١ - حدوث عملية إنتقال فرع البلازميد من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلة حتى فى حالة حدوث طفرة فى الخلايا الواهبة تسبب منع تخليق دنا الحلقة أى الحلزون الثانى المكمل. مثال لهذه الطفرات هى طفرة حساسة للحرارة temperature-sensitive mutation فى الجين الخاص بتخليق إنزيم بلمرة III (NA polymerase III gene).

٢ - يحدث إستمرارية فى تخليق دنا الحلزون المكمل فى الخلية الواهبة بالرغم من توقف إنتقال فرع البلازميد بواسطة طفرة مناسبة فى البلازميد.

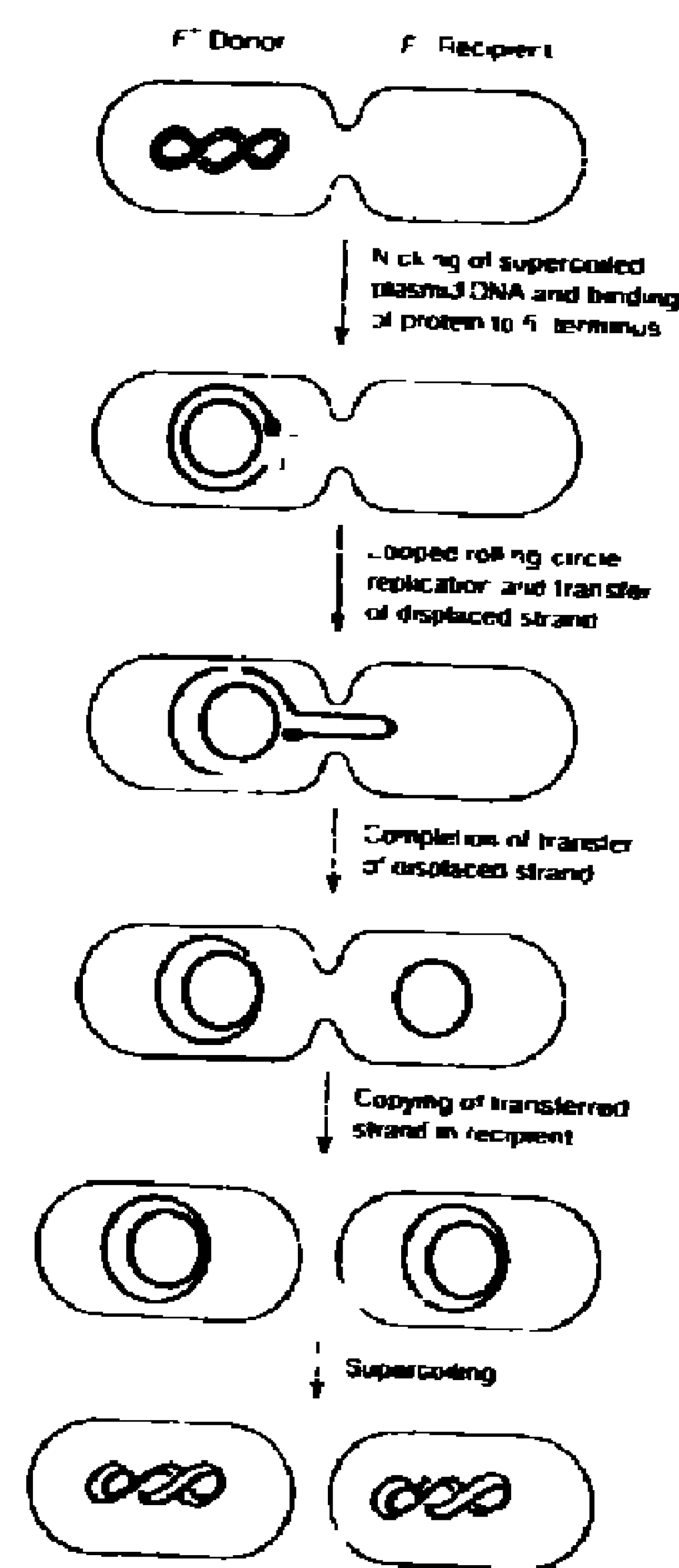
٣ - إنتقال فرع حلزون دنا من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلة يستمر بالرغم من حدوث طفرة فى الخلية المستقبلة تسبب منع تخليق حلزون دنا المكمل فى الخلية المستقبلة.

هذه الحالات المختلفة تسبب نشوء سؤال ما هى نوعية القوى المحركة التى تسبب حركة وإنتقال فرع دنا من الخلية الواهبة إلى الخلية المستقبلة.

تثبيط الخصوبة فى خلايا البكتيريا

Fertility Inhibition In Bacterial Cell

لو أن خلية واحدة من البكتيريا إ. كولاى تحتوى بلازميد F تم إضافتها إلى مزرعة من الخلايا النامية F^- فإنه بعد ١٥-٢٠ جيل من نمو الخلية فإن جزء كبير من الخلايا يصبح محتوى F.



شكل ١١٨: شكل يوضح آلية إنتقال بلازميد **F** من الخلايا الواهبة إلى الخلايا المستقبلة **looped rolling-circle mechanism.**

هذه الحالة نتيجة لنقل مكررات replica من F من خلية F^+ إلى خلية F^- بدون فقد F من خلية F^+. بعد الإنتقال يبقى مكرر F أى F ذاته فى الخلية الواهبة ويمكن أن يكرر نفسه مرة أخرى وهذا المكرر ينقل إلى الخلية F^- ثانية. كل خلية مستقبلة تكتسب F وتصبح واهبة وتنقل بدورها F إلى خلية مستقبلة أخرى أى F^-. وهكذا يمكن أن يحدث ذلك بإستمرار. فى الجيل الواحد للخلية يمكن أن تحدث عملية الإنتقال مرة أو مرتين، وهكذا ينتشر F بسرعة خلال مستعمرة أو عشيرة البكتيريا bacterial population.

وهذا الإنتشار السريع ليست هو الحال فى أغلب البلازميدات القابلة للإنتقال. مثال ذلك أن حوالى ٠,٠٢% من عشيرة الخلايا البكتيرية فقط هى التى تكون قادرة على نقل غالبية بلازميدات R وتسمى واهبات تنافسية competent donors. ولذلك لو أن مزرعة R^+ / lac^- خلطت مع مزرعة $R^- lac^+$ ثم خفف المخلوط ألف مرة بعد الخلط بقليل فلن يحدث إزدواج بين الخلايا بعد هذا التخفيف ويكون عدد الهجن أى الخلايا المعاد صياغتها recombinants بنسبة ٠,٠٢% من العدد الإبتدائى للخلايا R^+.

بعد حدوث الإنتقال، فى حالة حدوثه، فإنه يمكن إضافة عدد كبير من الخلايا المستقبلة -R بتركيز يسمح بحدوث إزدواج سريع للخلايا rapid pair formation وهكذا ينتشر البلازميد R بسرعة فى الخلايا المستقبلة. حركيات إنتقال البلازميد kinetics transfer أوضحت أن الخلية المستقبلة -R والتى إستقبلت البلازميد R فإنها فى التو واللحظة تكون قادرة على نقل البلازميد. هذه الظاهرة المسماه بتثبيط الخصوبة fertility inhibition تكون نتيجة لوجود ونشاط مانع عديد تحت الوحدات multisubunit repressor وهذا المانع يتحكم فى تكوينه جينين إسمهما *fin* tow fin genes. هذا المانع يعمل على العامل operator ويمنع نسخ الجينات اللازمة لعملية الإنتقال. غالبية البلازميدات R لها مانع نشط *fin* والذى يعمل

لخفض تكرارية الإنتقال إى درجة الإنتقال منخفضة. عند إدخال IS3 فـــى 0 *fin*، فإن F ينقصها أحد الجينين *fin* وتبعاً لذلك فإن النظام الخاص بالنقل ينسخ تركيبياً transcribed constitutively. فى حالة أغلب البلازميدات R عند حـــدوث إزدواج بين خلية واهبة وخلية مستقبلة فإنه يحدث منع المنع derepression أى لا يحدث منع لأن المانع غائب فى الخلية المستقبلة، ولذلك فإن الخلايا المستقبلة تنقل لتوها وفى لحظتها R إلى خلية أخرى وهكذا. بمرور الزمن يتم تخليق مانع وتقل الخصوبة.

العامل operator فى F يمكنه أن يلتصق ظاهرياً بمّوانع R لأن إنتقال F يقل بوضوح فى وجود البلازميد R وكما هو متوقع فعند إحتواء بلازميد R على جين *fin* معيب أى غير نشط أى غير فعال a defective *fin* gene فإن إنتقال F لا يقل ولا يثبط.

يجب ملاحظة أنه بالرغم من أن تثبيط الخصوبة خاصية عامة فى بلازميدات R ولكنها ليست خاصية لجميع البلازميدات R أى أن بعض بلازميدات لا توجد فيها هذه الخاصية.

الجينات الخاصة بالبلازميد F
tra Gene of F plasmid

فى الجزء السابق إتضح أن الإنتقال يتم التحكم فيه أو تنظيمه بواسطة الجينات *fin* وظائف الإنتقال أى الجينات المتحكمة فى الإنتقال transfer توجد فى أوبيرون ويسمى *tra*. ويوجد فى *tra* عديد من الجينات وهى على سبيل المثال جين *tra* A والتى تتحكم فى تكوين بيلين pilin والجينات *tra*, B, C, E, F, G, H, K, L, Q, U, V, W تتحكم فى تكوين الهديب pilus. جينات أخرى تكون لازمة لعملية الإزدواج (خلية واهبة وخلية مستقبلة) والإنتقال الزنادى triggering transfer والإنتقال الحقيقى actual transfer والقطع عند منطقة منشأ الإنتقال *ori*

T (nicking at the transfer origin *ori* T). وتضاعف أى تكرار دنا من منشأ التضاعف *ori* V (replication origin *ori* V) والتنافر السطحى surface exclusion أى عدم قدرة الخلية F^+ أن تزدوج مع خلية F^+ أى من نفس التركيب أى إحتواء البلازميد F وعدم التوافق بين البلازميدات plasmid incompatibilty (سيتم شرحه مؤخراً فى هذا الباب). هذه الجينات وجينات أخرى توجد فى الجدول (جدول ١٨) وعلى خريطة البلازميد F (شكل ١١٩).

جدول ١٨ : بعض جينات البلازميد F وموقعها ووظائفها.

الجين	الوظيفة
tra A	تحت وحدة رئيسية للهديب
tra B, C, E, F, G, H, K, Q, U, V, W	تخليق حيوى وتجميع وتكوين الهديب
tra G, N	إستقرار الإزواج المتقابلة المتزاوجة stabilization of mating pairs
tra H	إنزيم حلزنة DNA helicase
tra J	تنظيم الأوبيرون tra
tra M	بداية إنتقال البلازميد
tra S, T	التنافر السطحى، تثبيط التلامس والتزاوج mating بين الخلايا المحتوية على F
tra Y	قطع عند ori T
ori T	موقع قطع ليبدأ تضاعف الحلقة المكروره ونقل دنا
ori V	منشأ تضاعف دنا الحلقى
fin O, P	تثبيط الخصوبة، fin O، طفرة فى F ولكن ناتج جين fin O+ يمكن تموينه فى الإنتقال بواسطة بلازميدات أخرى.
inc B, C, E	عدم التوافق البلازميدى

ولذلك تعامل هذه البكتيريا معاملات خاصة لكى تجعلها قابلة للنقل الحيوى، قد تكون هذه المعاملات كيماوية وتسمى نقل حيوى كيماوى chemical transformation أو قد تكون كهربائية وتسمى نقل حيوى كهربائى electrotransformation. آلية تأثير هذه المعاملات على البكتيريا لكى تجعلها قابلة للنقل الحيوى غير معروفة وغير مفهومة. هذه الطرق أساس لكثير من تجارب الهندسة الوراثية والتى تحتاج معاملة دنا معملياً *in vitro* ثم إعادة هذا الدنا المعامل إلى خلية العائل للتكاثر والتكرار.

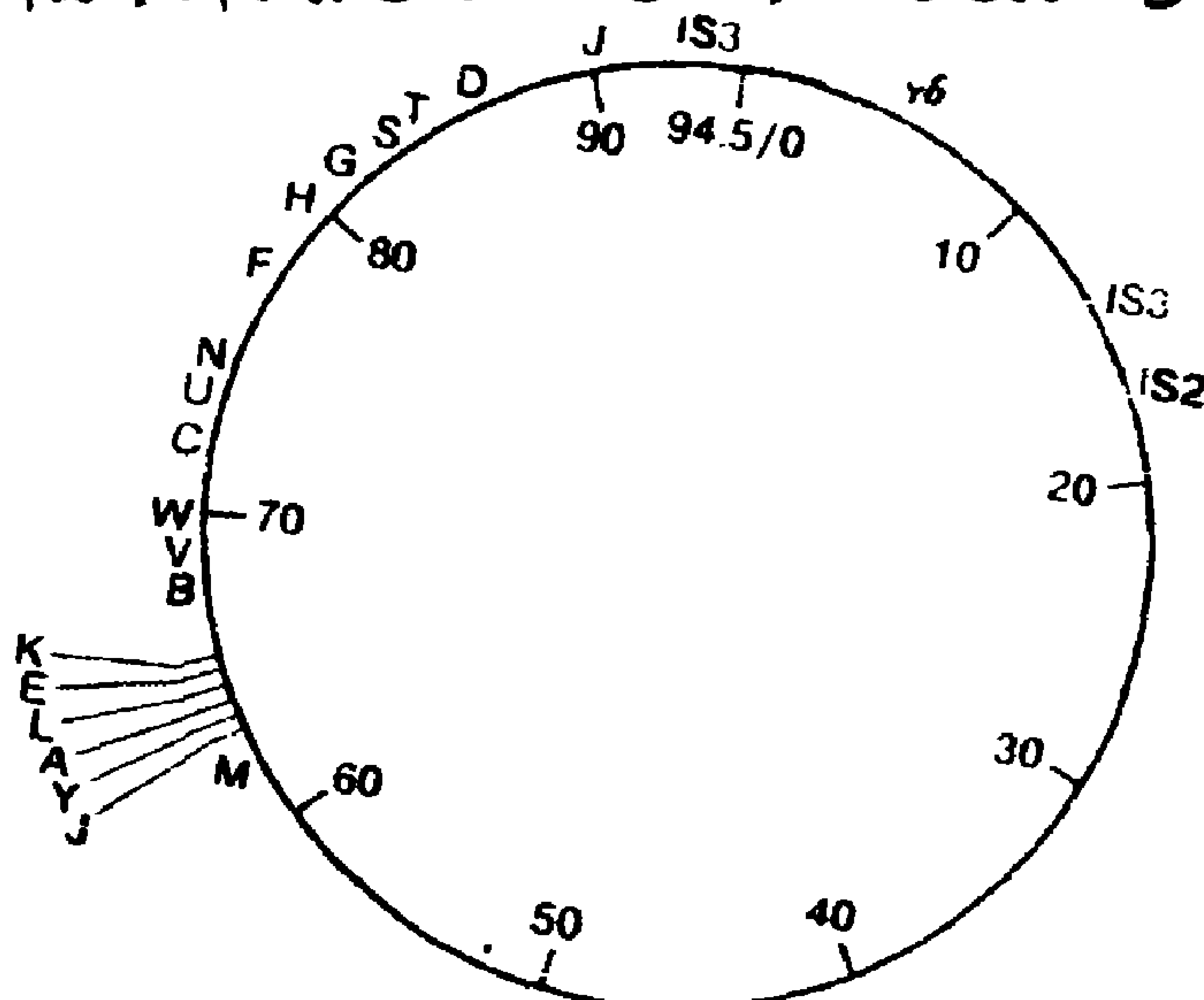
Some F plasmid genes and sites and their functions

Gene	Function
tra A	Pilin, major subunit of the pilus
tra B, C, E, F, G, H, K, Q, U, V, W	Biosynthesis and assembly of the pilus
tra G, N	Stabilization of mating pairs
tra H	DNA helicase
tra J	Regulation of the *tra* operon
tra M	Initiation of plasmid transfer
tra S, T	Surface exclusion, inhibition of mating netween F-containing cells
tra Y	Nicking at *ori* T
ori T	Site nicked to iniate rolling circle replication and DNA transfer
ori V	Origin of circular DNA replication
fin O, P	Fertilityt inhibition, *fin* O, is mutant in F but the *fin* O^+ gene product can be supplied in trans by certain other plasmids
inc B, C, E	Plasmid incompatibility

منع أو تحديد العائل لعملية الإنتقال للبلازميد

Host Retriction in Transfer

تحدث ظاهرة تحديد العائل لعملية الإنتقال فى الفاج بدرجة كبيرة فى الفاج وبدرجة أقل فى البلازميدات. ومثال ذلك أن $F^{'}\ lac^{+}$ لا ينتقل بكفاءة من السلالة K12 إلى السلالة B وذلك فى حالة البكتيريا إ. كولاى. ولكن فى الحقيقة أن الإنتقال يحدث ولكن دنا المنقول من السلالة K12 يتم تحطيمه بواسطة إنزيمات متخصصة وهى B-specific restriction nucleases عند دخوله السلالة B. يمكن أن توجد خلايا نادرة العدد جداً من السلالة B يمكن أن يتواجد بها $F^{l}\ lac^{+}$ وفى هذه الحالة يمكن نقله إلى خلايا مستقبلة من السلالة B ولكن لا يمكن أن يحدث الإنتقال عكسياً إلى السلالة K12. وما يحدث هنا أنه يحدث نقل حلزون واحد من البلازميد إلى الخلية المستقبلة وهذا بدوره لا يهاجم بكفاءة عالية بواسطة إنزيم restriction nuclease ولذلك يبقى، وعند إكتمال تكوينه أى تخليقه يصبح به مجاميع ميثيل بسرعة rapidly becomes methylated، وعند حدوث ذلك أى methylation فى حلزون واحد فإنه من المحال أن يهاجم بالإنزيم المذكور.



شكل ١١٩ : خريطة البلازميد F مقدرة بالكيلو قاعدة kilobases. الحروف الكابيتال capital تشير إلى منتصف موقع الجين فى أوبيرون tra. يلاحظ بعض التتابعات الأخـــرى sequences وهى IS3, IS2, j, δ.

نقل البلازميد معملياً

In Vitro Plasmid Transfer

كثيراً يكون من المرغوب فيه نقل بلازميد غير قابل للإنتقال إلى خلية عائل معين. يمكن نقل دنا طالما أن التركيب الوراثى يسمح بذلك فى الخلايا المستقبلة أى تقبل دنا البلازميد. ولذلك يتم عمل إنتخاب وراثى لوجود هذه الصفة فى الخلايا المستقبلة لكى تتقبل البلازميد. أخذ البلازميد أو دنا النقى يسمى بالنقل الخيوى أو الإنتقال الحيوى transformation. بعض أنواع البكتيريا قابلة لعملية النقل الحيوى. كثير من أنواع البكتيريا والتى تكون مفيدة فى الهندسة الوراثية غير قابلة للنقل الحيوى طبيعياً.

النقل الحيوى الكيماوى Chemical transformation:

عند معاملة بعض البكتيريا بكيماويات مناسبة فى وجود بيئة مناسبة يمكن أن تسبب هذه المعاملة أن تصبح الخلية قابلة لعملية النقل الحيوى الكيماوى. أكثر الطرق شيوعاً لتحضير خلايا بكتيريا قابلة لأخذ دنا أو البلازميد competent cell هى بعمل صدمة بمحلول تحتى التركيز لكاتيون الكالسيوم hypotonic Ca^{++} shock. هذه الخلايا التى تتأثر بهذه المعاملة تسمى بالخلايا القادرة competent cells وخطوات عمل هذه الطريقة كما يلى.

فى مرحلة مبكرة من الطور اللوغاريتمى للمزرعة البكتيرية early log phase culture يتم عمل طرد مركزى لهذه الخلايا ثم يعاد تعليقها فى الماء أو سائل فى صورة معلق فى محلول بارد تحتى التركيز من كلوريد الكالسيوم.

عند إضافة دنا إلى الخلايا فإنها تكون معقد دنا كالسيوم calcium-DNA complex والذى يدمص على سطح الخلايا. يتم تدفئة هذه الخلايا لمدة قصيرة وتكون بمثابة صدمة حرارية heat shocked والتى تسمح بنقل دنا إلى الخلية. توجد طريقة أخرى بديلة لتحضير الخلايا القادرة تشمل معاملة الخلايا بواسطة

بولى إيثيلين جليكول polyethylene glycol (PEG) وداى ميثيل أكسيد الكبريت dimethylsulfoxide (DMSO). وفى هذه الحالة معقد دنا -PEG يدمص على سطح الخلية. DMSO يجعل غشاء الخلية منفذ لمعقد دنا -PEG. كلا الطريقتين السابقتين ينتج عنهما زيادة فى كفاءة عملية النقل الحيوى وتقدر كمياً بحوالى ٢ × ١٠^٨ خلية محولة لكل ميكروجرام دنا.

فى حالة نقل دنا سواء من البلازميد أو الفاج قادر على التضاعف أى التكرار إلى خلية مستقبلة فإن إمكانية تضاعفها أى تكرارها تبقى دائماً ثابتة فى الخلايا المستقبلة. لو أنه تم نقل شظية من دنا خيطى linear إلى خلية بكتيريا إ. كولاى، فإن هذه الشظية يتم هضمها بواسطة إنزيم نيوكلييز خارجى V أى exonuclease V.

توجد تجربة مميزة لعملية نقل بلازميد R يحتوى على مقاومة للتراسيكلين (Tet^r) إلى خلية بكتيريا حساسة للتراسيكلين (Tet^s) وذلك بالنقل الحيوى بطبيعة الحال ثم زراعة خلايا البكتيريا المستقبلة على بيئة آجار مغذى محتوية تتراسيكلين. جميع مستعمرات البكتيريا المقاومة للتراسيكلين تحتوى على بلازميد. كانت المقارنة فى هذه التجربة هى زراعة الخلايا العادية فقط أو دنا فقط. كانت المقارنة خالية من أى نمو بالطبع إلا فى حالة واحدة وهى وجود طفرة ذاتية لمقاومة التتراسيكلين spontaneous Tet^r mutants. وبالطبع لأن معدل حدوث الطفرات الذاتية فى الخلايا والمزارع المقاومة للتتراسيكلين هى أقل من ١٠^-٨ فلم تحدث طفرات ونمو فى المقارنة. ولذلك لو أن كمية من دنا البلازميد تم إضافتها للخلايا البكتيرية بهذه الطريقة وبحيث أن جميع الخلايا البكتيرية تأخذ دنا أى تصبح خلايا قادرة فإن قليل من هذه الخلايا تصبح حساسة للتتراسيكلين أى أن نسبة الخلايا الحساسة للتتراسيكلين تكون منخفضة.

النقل الحيوى الكهربائى Electrotransformation:

يمكن للخلايا أن تأخذ دنا خارجى exogenous DNA بواسطة النقل الحيوى الكهربائى electrotransformation. عند تعريض الخلايا لتيار كهربائى أى حقل كهربائى، يحدث قطبيه فى الغشاء البلازمى، ويحدث جهد كهربائى عبر الغشاء. لو أن الجهد الكهربائى تعد مستوى معين يسمى مستوى المدخل أو مستوى البداية exceeds threshold level، تتكون ثقوب صغيرة وقتية فى الغشاء وتجعل الخلايا منفذة للجزيئات الكبيرة الحجم المضافة خارجياً للخلايا ومنها دنا. أخذ دنا الخارجى بواسطة التثقيب الكهربائى electroporation يسمى النقل الحيوى الكهربائى Electrotransformation بالرغم من أن التثقيب الكهربائى يحتاج إلى جهاز خاص، فإن له مميزات عديدة عن النقل الحيوى الكيماوى:

١ - تحضير الخلايا سهل وسريع. تغسل مزرعة من الخلايا بشدة (لإزالة الملاح من البيئة) ثم يعاد توزيعها ونشرها فى الماء أو سائل أى تصبح فى صورة معلق فى محلول منخفض القوة الأيونية low ionic strengthg.

٢ - كفاءة النقل الحيوى الكهربائى يزيد مرات عديدة عن طريق النقل الأخرى كفاءة. التثقيب الكهربائى فى البكتيريا إ. كولاى أو *Salmonella typhimurium* ينتج عنها 10^{-9} إلى 10^{-10} خلايا محولة كهربائياً electrotransformation لكل ميكروجرام دنا بلازميدى.

٣ - كفاءة النقل الحيوى لكهربائى للبكتيريا إ. كولاى و *S. typhimurium* مرتفعة جداً حتى أنه يمكن نقل البلازميدات مباشرة بين الخلايا بدون تنقية دنا قبل الإستعمال.

٤ - مدى النقل الحيوى الكهربائى أقل حساسية بالنسبة لحجم ونقاء واهبات دنا بالنسبة لطرق النقل الحيوى الأخرى. حيث أن النقل يحدث فى أحجام

كبيرة نسبياً ودرجة نقاوة قليلة نسبياً بالمقارنة بالطرق الأخرى. النقل الحيوى الكهربائى لبلازميدات زائدة الحلزنة أو مرتخية تتراوح أحجامها بين ٢-٤٤ كيلو قاعدة kb يحدث بكفاءة عالية.

٥ - مدى واسع من أنواع وأجناس البكتيريا يمكن أن ينقل حيوياً بواسطة التثقيب الكهربائى، يشمل ذلك بكتيريا عديدة يحدث لها تحوير بصعوبة أى قابلية للنقل الحيوى بصعوبة أو لا يحدث لها تحوير إطلاقاً أى لا يحدث لها قابلية للنقل الحيوى إطلاقاً، بالطرق الأخرى (تحوير مقصود به قابلية للنقل الحيوى).

جهاز التثقيب يولد نبضة تيار كهربائى سريع عال الفولت خلال أنبوبة الكوارتز cuvette المحتوية على الخلايا مخلوطة مع دنا. يتم تخزين الفولت فى capacitor ويتحرر على هيئة نبضة كهربائية والتى decays exponentially.

الفولت الإبتدائى initial voltage والذى يرمز له V_0 يحدث له تحلل decays خلال الزمن تبعاً للمعادلة الآتية:

$$V_t = V_0 e^{-t/\tau}$$

$$\tau = R \times C$$

R عبارة عن المقاومة بالأومات ohms (Ω).

C عبارة عن capacitance بالفارادس farads.

t ثابت الزمن بالثوان.

τ عبارة عن الزمن اللازم للفولت لكى يتحلل إلى 1/e (أى حوالى ٣٧%) من الفولت الإبتدائى. τ تكون متناسبة مع طول فترة النبضة الكهربائية pulse.

فى حالة الظروف التى تستخدم لعمل تثقيب كهربائى لبكتيريا القولون فإن τ المثالى. يكون ٤-٥ مللى ثانية msec.

جهد الفولت potential voltage خلال غشاء خلال غشاء الخلية يكون متناسب

مع منحدر أى تدرج الفولت voltage gradient بين اللإلكترودين ويسمى أيضاً بالحقل الكهربائى (E).

$$E = V / D$$

حيث أن d المسافة بين الإلكترودين أى هى عبارة عن طول الممر path length للكيوفيت cuvette أى عبارة عن طول المسار فى أنبوبة الكوارتز. ولذلك فإن E و τ أهم متغيرات كهربائية تؤثر على التثقيب الكهربائى. لو أن E صغيرة جداً فإن جهد الفولت عبر الغشاء يكون صغيراً جداً ولا يؤثر على الغشاء البلازمى ولذلك لا يحدث التثقيب الكهربائى أو الإنفاذ الكهربائى. لو أن E مرتفعة جداً فإن غشاء الخلية يختل أو يفسد ولا يرجع مرة أخرى لحالته الطبيعية أى يكون الإختلال غير عكسى. يمكن ضبط E بتغيير الفولت أو تغيير طول المسار فى أنبوبة الكوارتز cuvette. تكون الدرجة المثلى للتثقيب الكهربائى للبكتيريا إ. كولاى والبكتيريا *S. typhimurium* أى الدرجة المثلى لـ E بين ١٢,٥ إلى ٢٠ كيلو فولت لكل سم kV/cm. ولكن الدرجة المثالية للبكتيريات الأخرى تكون مختلفة عن ذلك.

تضاعف أى تكرار أى تكاثر البلازميد

Plasmid Replication

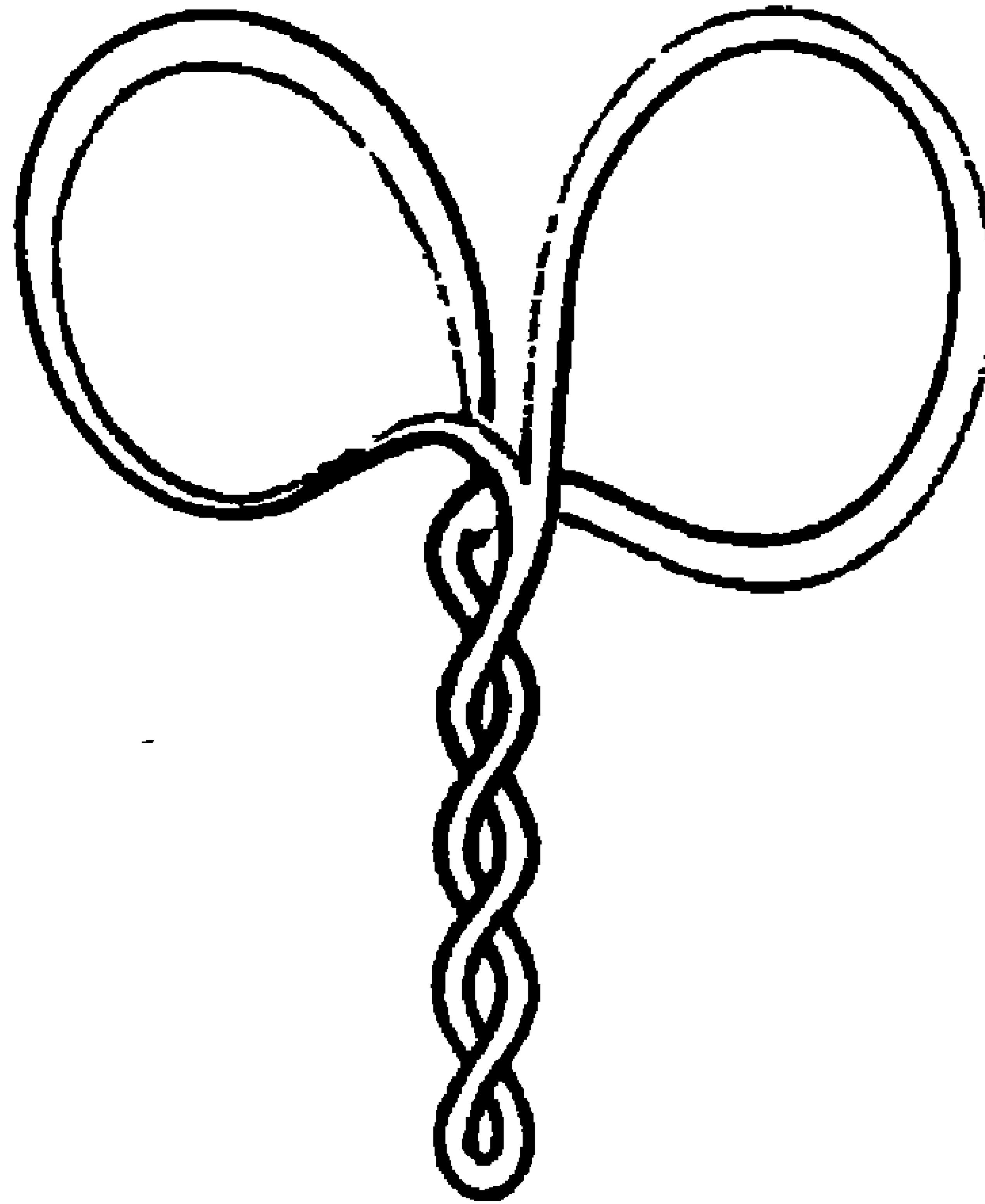
يتكاثر البلازميد فقط داخل خلية العائل وكل طراز من البلازميد يجب أن يحتوى على نفس التركيب أى نوع التتابع من نيوكليوتيدات دنا. يتضاعف أى يتكاثر البلازميد بطريقة منظمة رتيبة محكومة ordered manner كما فى الفاجات، على أى حال، يوجد إختلافات شاسعة فى كل من الإنزيمات وأيضاً فى آلية تضاعف أى تكاثر دنا البلازميد كما سيتم شرحه فى الأجزاء الآتية:

إستخدام بروتينات العائل فى تضاعف البلازميد

Use of host proteins in plasmid replication

تعتمد البلازميدات بشدة على البروتين الذى يستخدم فى التكاثر على العائل أى تستخدم بروتين العائل. يعتبر دنا بول ٣ (DNA Pol III) البروتين الرئيسى اللازم لتضاعف كروموسوم البكتيريا إ. كولاى، ولكن بعض البلازميدات تستخدم البروتين دنا بول ١ (DNA Pol 1) بدلاً منه. مثال ذلك، فى طفرات *pol* A والتى لها مستوى منخفض جداً من Pol I فإن البلازميد F يتكاثر أى يتضاعف طبيعياً ولكن البلازميد ColE1 يفشل فى التضاعف، وذلك لأن تضاعف دنا الخاص بـ F يستخدم Pol III ولكن ColE1 يستخدم Pol I. بعض البلازميدات تستخدم نواتج جين العائل تماماً أى معتمدة عليه كلية فى هذا الشأن. مثال ذلك أنه يمكن تكرار ColE1 فى المعمل *in vitro* بإضافة بروتين دنا ColE1 نقى إلى مستخلص الخلايا المجهز من خلايا لا تحتوى على ColE1 أو أى بلازميد آخر. تكاثر بلازميدات أخرى يحتاج إلى بعض نواتج جين موجود بالبلازميد some plasmid-encoded gene products. مثال ذلك حالة البلازميدات F' *lac* تحمل طفرة حساسة للحرارة فى F وقد تم عزلها وهى غير قادرة على التضاعف عند درجة ٤٢ مئوية ولذلك فإن عند هذه الحرارة فإن البلازميد F' (Ts) *lac*+ يفشل فى التكاثر أى التضاعف وبالتالى ينعزل بسرعة من العشيرة نتيجة لإنقسام الخلايا البكتيرية. جميع البلازميدات التى تم فحصها الآن تتضاعف أى تكرر نفسها بطريقة شبه محافظة semiconservatively وتستمر حلقية خلال دورة التضاعف. توجد إختلافات جوهرية، على أى حال، فى طرز أو طريقة التضاعف بين البلازميدات المختلفة. مثال ذلك أن بعض البلازميدات تتضاعف فى إتجاه واحد unidirectionally والأخرى تتضاعف فى إتجاهين bidirectionally يتضاعف البلازميد RK6 أولاً فى إتجاه واحد ثم بعد ذلك فى الإتجاه العكسى بالنسبة للأصل الواحد. عند تضاعف البلازميدات فى إتجاهين فإن طريقة إنهاء التضاعف تكون بإحدى

طريقتين. أحد الطريقتين يحدث عند إصطدام الشوك النامية growing forks collide. والطريقة الثانية أن بعض البلازميدات لها موقع إنتهاء ثابت حيث أنه فى بعض الأحيان يتم الوصول إلى هذا الموقع بواسطة شوكة نامية واحدة وقبل أن تصل إليها الشوكة النامية الأخرى. فى أغلب البلازميدات التى تم دراستها بعناية يحدث التضاعف بواسطة ما يسمى طراز الفراشة أو أذن الأرنب butterfly or rabbits ear mode (شكل ١٢٠). فى هذا النوع يكون الجزيىء أى البلازميد المتضاعف جزئياً محتوى على أجزاء متضاعفة غير ملتفة untwisted replicated portions كما هو المعتاد فى حالة تضاعف θ وجزء غير متضاعف زائد الحلزنة supercoiled unreplicated portion. عند إكتمال حدوث التضاعف فإن إحدى الحلقتين تنشق لتفصل الحلقتين البنويتين daughter. نتيجة دورة واحدة من التكاثر هى تكوين جزيىء مقطوع وجزيىء آخر زائد الحلزنة. بعد ذلك يحدث للجزيىء والمقطوع إلتئام وبعد فترة يصبح زائد الحلزنة.



شكل ١٢٠: يوضح تركيب جزيء الفراشة أو أذن الأرنب.

ضبط عدد النسخ Control of copy number:

إتضح فيما سبق أن البلازميدات تستعمل طبيعياً أغلب آلية التضاعف الخاصة بالعائل replication machinery of the host. كل نوع من البلازميد، على أى حال، يمتلك جيناته الخاصة والتى تنظم سرعة بدء التضاعف أى التكرار أى التكاثر وبالتالى تحدد عدد البلازميدات لكل خلية. يمكن تصنيف البلازميدات على أساس عدد البلازميدات فى كل خلية إلى بلازميدات قليلة العدد فى الخلية stringent or low copy number وفى هذه الحالة يكون عدد البلازميدات محدود بدرجة كبيرة بلازميد أو بلازميدين لكل خلية وبلازميدات كثيرة العدد فى الخلية relaxed or high copy number وفى هذه الحالة يكون عدد البلازميدات يتراوح بين ١٠-١٠٠ بلازميد لكل خلية. النقل الحيوى transformation للنوعين السابقين من البلازميدات قد تم إستعماله لتوضيح أن عدد النسخ يتم تحديده وتنظيم تخليقه وذلك عن طريق التحكم فى سرعة بدء تخليق دنا rate of initiation of DNA syntyhesis. لو أن مزرعة خالية من البلازميدات تم عمل نقل حيوى transformed بواسطة دنا بلازميدات مع النوع قليلة العدد (النسخ) وبتركيز مدروس عملياً من دنا بحيث أن الخلية الواحدة لا تستقبل أكثر من نسخة واحدة من البلازميد أى بلازميد واحد، فإن البلازميد سوف يكرر نفسه مرة أو مرتين قبل إنقسام الخلية. لو أن الخلية تم عمل نقل حيوى لها بواسطة جزيىء مفرد من دنا البلازميد (نسخة واحدة) وهذا البلازميد كثير العدد (عديد النسخ) فإن دنا البلازميد يكرر نفسه مرات عديدة حتى الوصول إلى عدد النسخ الكثير والخاص بهذا البلازميد داخل الخلية الواحدة.

أحد الآليات لتنظيم عدد النسخ من البلازميد داخل الخلية الواحدة هو أن البلازميد يحتوى مانع repressor ينظم بالسالب negatively regulates منشأ أو بداية التكرار أى التضاعف. كيف يحدث ذلك بالتفصيل لكى يحدث إستمرارية فى عدد النسخ من جيل إلى آخر. نفترض أن نشاط المانع يعتمد على تركيزه. ولذلك

فإنه عندما تنمو الخلية فى الحجم يقل تركيز المانع أى يصبح مخفف بدرجة كبيرة ولذلك لا يحدث تثبيط لعملية تكرار أى تضاعف دنا، حيث أن التركيز المنخفض من المانع يمنع نشاطه. عند هذا الحد وبعد تضاعف دنا البلازميد أو البلازميد فإنه يوجد ضعف العدد الإبتدائى للجينات المانعة ولذلك وأيضاً نتيجة لتخليق البروتين فإن تركيز المانع أيضاً يتضاعف مسبباً منع التضاعف أى التكرار. يحدث أيضاً نفس التتابع من الأحداث فى حالة وجود نسخة واحدة من بلازميد عديد النسخ high-copy-number-plasmid، حيث أن التكرار يستمر حدوثه يتكون المانع بتركيز كاف مسبباً وقف عملية التخليق أى التكرار. كيف أن هذا التفسير يفسر الإختلاف فى عدد النسخ؟. تفسير ذلك هو أنه فى حالة البلازميدات العديدة النسخ فإن المنع التام أى التثبيط للتخليق لتكرار دنا التام يحتاج إلى تركيز مرتفع من المانع عنه فى حالة البلازميدات القليلة النسخ، وهكذا عندما يكون عدد البلازميدات لكل خلية مرتفع فإن الجرعة الجينية gene dosage تكون مرتفعة بدرجة كافية لحدوث التثبيط.

توضح التجربة التالية أن كل بلازميد يتحكم ويضبط عدد النسخ الخاصة به. تم بناء بلازميد هجين pSC134 was constructed pSC134 والذى يتكون من خليط من نسختين كـــاملتين لبلازميدين مختلفين هما ColE1، pSC101 (وهذا البلازميـــد الأخير pSC101 مشتق من البلازميد R). تحت الظروف المستعملة فى هذه التجربة، فإن عدد النسخ لهذين البلازميدين تكون ١٦، ٦ (شكل ١٢١). البلازميد ColE1 يتكاثر فى الخلية *pol* A^+ ولكنه غير قادر على التكاثر فى طفرة فى الخلية والتى تركيبها *pol* A^- ويصل فى العدد إلى ١٦ بلازميد فى الخلية *pol*A^+. أما البلازميد pSC101 فـإنه قادر على التكاثر فى الخلية *pol* A^+ والخلية الطفرة *pol*A^- ويصبح عدده فى الخلية الواحدة ٦.

أما الأرقام فى الشكل الموضوعة فى مربع وهى ١، ٢، ٣ فهى تدل على أرقام الحالات الآتية:

١ - فى الخلايا البرية الخلايا العادية أى *pol* A+ فإن البلازميد pSC134 يتكاثر من بداية التضاعف replication origin للبلازميد ColE1 ولـــذلك يصـــل عدده إلى ١٦ نسخة فى الخلية الواحدة مساوياً فى ذلك لعدد البلازميدات ColE1 فى الخلية الواحدة.

ولذلك فإن صفة منشأ البلازميدات عديدة النسخ تكون ســائدة علـــى صفة البلازميدات قليلة النسخ وهى ٦.

٢ - فى حالة عمل نقل حيوى transformation للبلازميد الهجــين pSC134 إلى داخل خلية غير برية أى طفرة -*pol* A. فنه من المعروف كما ســبق أن البلازميد ColE1 لا يمكن أن يتكاثر فى خلية طفرة أى -*pol* A، ولذلك فإنه يتم إستخدام منشأ التضاعف للبلازميد pSC101 ويصبح عدد النسخ ٦ وهو الرقم الخاص بالبلازميد pSC101. هاتين النتيجتين من رقم ١، ٢ توضح أن عدد نسخ البلازميد مرتبط تماماً بنــوع منشـــأ التضـــاعف replication origin المستعمل. إذا كان منشأ التضاعف خاص بالبلازميد ColE1 يكون ١٦ نسخة إذا كان منشـــأ التضـــاعف خـــاص بالبلازميـــد pSC101 يكون ٦ نسخ.

٣ - لو أنه تم نقل البلازميد pSC101 نقلاً حيوياً إلى خلية بكتيريا تحتوى ١٦ نسخة من البلازميد pSC134 بواسطة نقـــل حيـــوى بواســـطة كلوريـــد الكالسيوم فإن البلازميد pSC101 لا يمكنه التكاثر أى التكـــرار. يرجـــع سبب عدم التكرار أنه يتم تخليق مثـــبط بواســـطة البلازميـــد الهجـــين pSC134 يسبب تثبيط أى منع تضاعف أى تكرار البلازميد pSC101.

ملخص لشرح نتائج التجارب السابقة كما يلى. عندما يكون عدد النسخ أقل من ٦ فإن كل من منشأ التضاعف أو التكرار فى حالة pSC101 وأيضاً منشأ التضاعف أو التكرار فى حالة ColE1 سيكونان نشيطين ولذلك يسببا زيادة عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة.

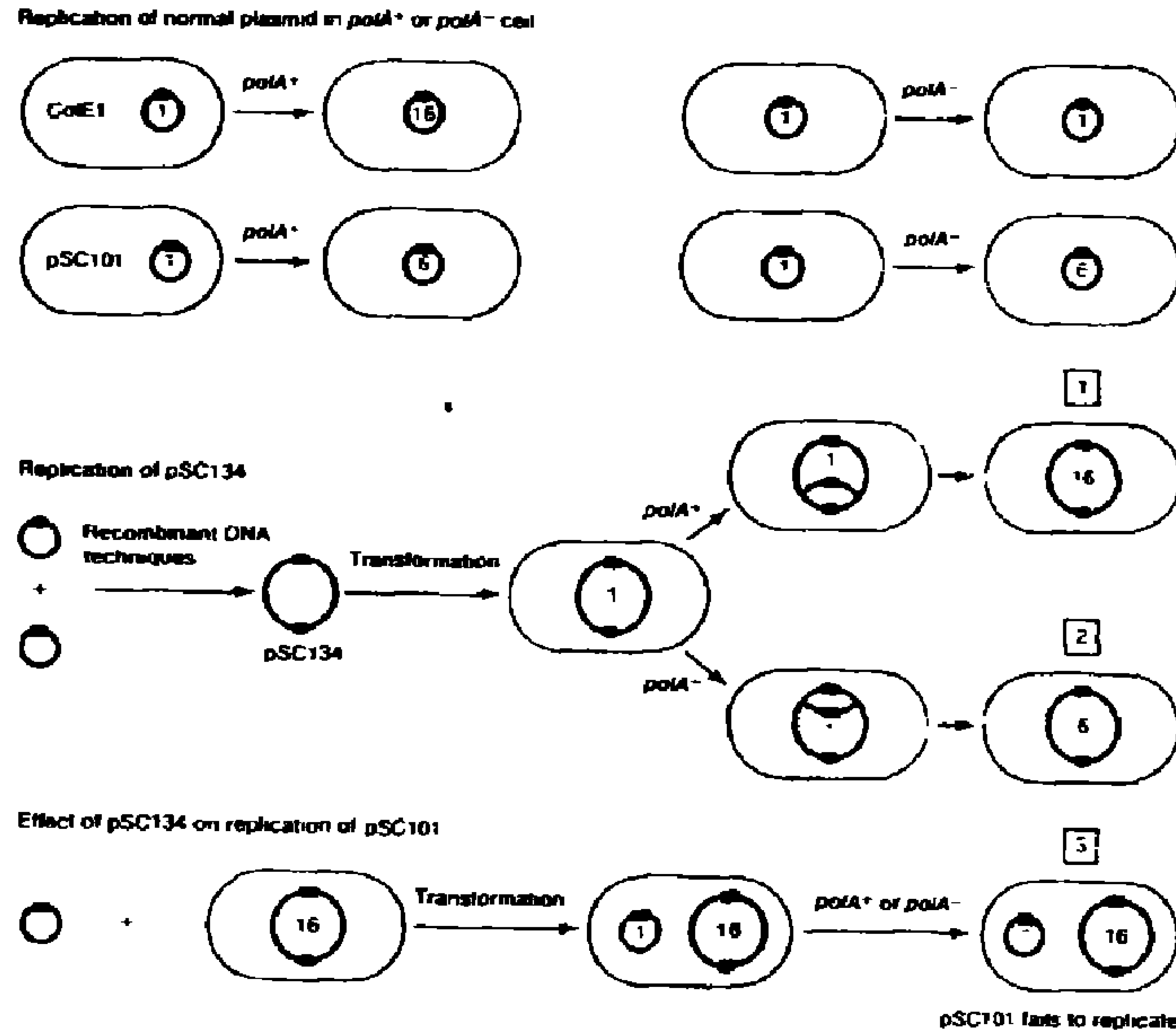
لو أن عدد النسخ أكبر من ٦ فإن الأصل pSC101 لن يكون نشيط بل يكون خامل لأن تركيز المثبط pSC101 يكون أعلى من مستو التثبيط الخاص به أى مثبط تماماً له. تكرار pSC101 سيستمر، ولكن لو كانت ذاتية التنظيم self-regulated، عامة لن يتجاوز التركيز ذلك المنتج بواسطة عدد النسخ. سيظل المنشأ أو الأصل للتكرار لـــ ColE1 نشط حتى يصل عدد النسخ إلى ١٦ أو حوالى ١٨ فى‌لا الخلية الواحدة. فى حالة الطفرة *pol* A^- فإن البلازميد ColE1 لا يمكنه التضاعف وتبعاً لذلك فإن عدد النسخ يتم التحكم فيه تماماً وكلية بواسطة تركيز المثبط لبلازميد pSC101 وهكذا لن يتعدى قيمته الطبيعية أى معدله العادى أى العدد العادى للبلازميدات. هذا التوضيح ثابت فى تجارب أخرى مختلفة عديدة وينطبق عليها نفس التفسير والذى يفسر ذلك دور (أو موديل) المانع repressor model فى تفسير آلية التنظيم لعدد البلازميدات فى الخلية الواحدة.

The repressor model of copy-number regulation

النبذة التالية الهامة يجب فهمها وأخذها فى الإعتبار وهى الخاصـــة بموديـــل المانع أى آلية عمل المانع. فى حالة سلالة تحتوى على طراز بلازميـــدى واحـــد فإن جميع البلازميدات فى الخلية الواحدة تكون متماثلة تماماً وهكذا فإن جزيىء المانع (لغالبية البلازميدات) لا يمكنه التمييز بين جزيىء دنا البلازميد والآخر فى نفس الخلية الواحدة. وهكذا، عندما يكون تركيز المانع منخفض بدرجـــة كافيـــة بحيث أن جميع جزئيات دنا أى البلازميدات لا يمكن كبحها أى منعها أى تثبيطها أى أن البلازميدات تتضاعف أى تتكرر فإنه يمكن سحب عدد منها إعتباطياً مـــن العشيرة.

أى بلازميد أصلى يتكاثر ويكون بلازميدين بنويين فإن كل بلازميد بنوى يمكن أن يتكاثر مرة أخرى ومرات عديدة ليعطى نفس التركيب مماثل تماماً للبلازميـــد الأصلى. ولذلك فى أى حالة فإن جزيىء البلازميد المختار للتكـــاثر أى التكـــرار

يمكن إختياره بواسطة الإنتخاب العشوائى random selection من العشيرة الكلية للبلازميدات ويكون له نفس التركيب لنسخ البلازميدات الأخرى.



شكل ١٢١: يوضح تضاعف البلازميدات ColE1، pSC101، pSC134 أى تكرارها أى تكاثرها لكل خلية بكتيرية واحدة. الدائرة السوداء هى منشأ تضاعف ColE1 والمربع الأسود هو منشأ تضاعف pSC101. الأرقام ١، ٦، ١٦ تدل على عدد النسخ من البلازميد لكل خلية. الأرقام ١، ٢، ٣ داخل مربعات تدل على ما هو مكتوب لأرقام الشرح الخاصة بهذا الجزء. (أنظر الشرح رقم ١، ٢، ٣).

زيادة عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة (تكبير البلازميدات)

Plasmid Amplification:

تظهر بعض البلازميدات عديدة النسخ ظاهرة تسمى التكبير amplification. فى حالة إضافة مثبط للبروتين مثل كلورامفينكول إلى مزرعة بكتيريا حاوية للبلازميدات، فإنه يحدث تثبيط أثناء البدء فى تضاعف الكروموسوم ولكن بالرغم من ذلك يستمر البلازميد فى التضاعف أى التكاثر حتى يصل عدد البلازميدات

لكل خلية ألف أو أكثر. يتم تثبيط تضاعف دنا البكتيرى لأن كل مرة عند بداية تضاعف دنا الكروموسوم يتم الإحتياج إلى بروتين جديد. لو أن البلازميد يستعمل فقط بروتينات التضاعف البكتيرية الثابتة stable bacterial replication protein أو بروتينات ثابتة مشفرة بالبلازميد stable plasmid endcoded proteins فإن تخليق دنا البلازميد يمكن أن يستمر. بالإضافة إلى ذلك لأن مانع عدد نسخ البلازميد plasmid copy-number repessor أى البروتين المانع لتكاثر البلازميدات فى الخلية يعتبر مثبط معتمد على التركيز، وحيث أن المانع لا يمكنه أن يتراكم فى غياب تخليق البروتين فإن تضاعف البلازميد أى تكاثره يكون بدون تنظيم أو قيادة أى غير محكوم unregulated وهكذا يصل عدد نسخ البلازميدات فى الخلية الواحدة ألف أو أكثر.

طريقة التكبير للبلازميدات تعتبر طريقة ملائمة لزيادة كمية دنا البلازميدات والذى يمكن عزله من مزارع بكتيرية. وقد إستعملت طريقة التكبير بكثرة فى الهندسة الوراثية قبل إكتشاف وإستخدام وتطويع إستخدام الخلايا ذات العدد الكبير من نسخ البلازميدات طبيعياً دون تكبير وأيضاً قبل أن تكون طرق تنقية البلازميدات المحسنة المتطورة بدرجة هائلة متاحة. أى الآن لا يستخدم التكير فى الهندسة الوراثية وتستخدم سلالات من البكتيريا تحتوى كل خلية على عدد كبير من نسخ البلازميدات طبيعياً كما تستخدم أيضاً طرق تنقية البلازميدات الحديثة المتطورة بدرجة هائلة.

عدم التوافق فى البلازميدات Incompatibility:

أزواج البلازميدات (زوج من البلازميدات أى إثنين) القريبة من بعضها وراثياً بدرجة كبيرة لا يمكن أن تبقى ثابتة فى خلية واحدة. وتسمى هذه البلازميدات بأنها غير متوافقة incompatible. موديل المانع السابق شرحه والخاص ببدء أى نشوء تضاعف أى تكاثر البلازميدات يشرح أيضاً هذه الظاهرة.

بإفتراض أن الخلية تحتوى على بلازميدين ولنفترض أنهما F، ColE1 وأنها تحتوى موانع مختلفة. تكرار أى تضاعف أى تكاثر كل طراز من بلازميد يبدأ ويستمر مستقل عن الآخر لأن مانع طراز لن يؤثر على الطراز الآخر أى مانع الطراز أو النوع F لن ينظم تكاثر الطراز الآخر ColE1 ولذلك فإن F، ColE1 يكونان متوافقان، وبقول آخر يمكن وضعها بأنهما يتبعان مجاميع عدم توافق مختلفة different incompatibility groups.

فإفتراض أن الخلية تحتوى على بلازميدين ولنفترض أنهما F، ColE1 وأنها تحتوى موانع مختلفة. تكرار أى تضاعف أى تكاثر كل طراز من بلازميد يبدأ ويستمر مستقل عن الآخر لأن مانع طراز لن يؤثر على الطراز الآخر أى مانع الطراز أو النوع F لن ينظم تكاثر الطراز الآخر ColE1. ولذلك فإن F، ColE1 يكونان متوافقان، وبقول آخر يمكن وضعها بأنهما يتبعان مجاميع عدم توافق مختلفة different incompatibility groups.

يختلف الوضع تماماً فى حالة البلازميدين A، B حيث أن الموانع الخاصة بهم إما أن تكون متماثلة أو متشابهة بدرجة كافية بحيث أن المانع الخاص بـــ A يمكنه تنظيم تكرار أى تكاثر B والعكس صحيح. لو إفترضنا أن خلية تحتوى نسخة واحدة من A وأخرى من B وأن هذه الخلية تنمو وتكبر بدرجة كافية بحيث أن بداية التضاعف أى التكاثر يمكن ملاحظتها (شكل ١٢٢). لأن نسَخ البلازميدين تم إختيارها إعتباطياً أى عشوائياً للتضاعف فإن نتيجة التضاعف الأول هو وجود خلية تحتوى إحدى الحالتين نسخة من A ونسختين من B أو نسخة من B ونسختين من A. عند حدوث التضاعف أى التكرار الثانى فإن كل خلية ستحتوى أربعة بلازميدات ولكنها تعتمد على البلازميد المتضاعف المتكاثر ولذلك يكون التركيب إما 3B و 1A أو 2B أو 2A أو 1B، 3A. عند هذا الحد فإن الخلية التى تحتوى على ضعف العدد الإبتدائى للبلازميدات يمكنها أن تنقسم. تركيب البلازميد فى الخليتين البنويتين سيكون أحد الحالات الآتية:

١ – 3B، 1A تصبح خلية 1B + 1B وخلية 1B + 1A.

٢ – 2B، 2A تصبح أحد الإحتمالين.

الإحتمال الأول خلية 1A، 1A وخلية أخرى 1B + 1B.

الإحتمال الثانى خلية 1B، 1A وخلية أخرى 1B، 1A.

٣ – 1B، 3A تصبح خلية 1A + 1B وخلية 1A + 1A.

لاحظ أن الطرازين المكنين من الخلايا هى (1A، 1A) وأيضاً (1B، 1B) تحتوى على نوع واحد فقط من البلازميدات والخلايا البنوية التى تم الحصول عليها من هذه الخلايا بالطبع ستستمر لتحتوى نوع واحد فقط من البلازميدات. فى الحالات الأخرى وحيث تحتوى الخلية الواحدة على بلازميدين مختلفين A، B فإنه نتيجة لإنقسامها سيكون ٥٠% من النسل الناتج ينتج خلايا بنوية تنقصها أحد البلازميدين أى تكون بها 1A + 1A أ، بها 1B + 1B. ولذلك فإنه عند البداية بخلية بكتيرية واحدة تحتوى على بلازميدين متوافقين 1A + 1B فإنه عند الإنقسام وبعد إقسامات عديدة يكون نسل هذه الخلية محتوى على خلايا بها طراز واحد من البلازميد 1A + 1Aأ، IB + IB وهكذا فإن هذه الخلايا الأخيرة تزيد عشيرتها مع كل إنقسام وكل جيل للبكتيريا. أى أن النسبة المئوية للنسل المحتوى على بلازميدين من نفس الطراز Aأ، B ستزداد مع كل جيل. وهكذا تفسير عدم التوافق incompatibolity يكون نتيجة لما يأتى:

١ – كلا البلازميدين A، B لهما مانع مشابه.

أ – الإنتخاب العشوائى للبلازميــدات أثناء تكاثــرها أى تكرارها أو تضاعفها.

مئات البلازميدات قد تم تصنيفها إلى أنواع مختلفة من مجاميع عدم التوافق incompatibility groups. هذا التصنيف له أهمية لأن أفراد أى خلايا المجموعة الواحدة تكون ذات أصل نشوء وتطور واحد أى أنها متشابهة تطورياً من ناحية النشوء والتطور وخاصة بالنسبة للصفات الخاصة بوظائف التكاثر أى التكرار أى

التضاعف للبلازميدات وخاصة التى لها علاقة بصفات أو خواص أو ملامح الهدبيات pili.

يمكن تصنيف البلازميدات إلى مجاميع عدم توافق بإستخدام الإختبارات التالية:

١ – نقل بلازميد B إلى خلايا مزرعة بكتيرية محتوية على بلازميد A ثم الإنتخاب لوجود البلازميد B من هذه الخلايا البكتيرية. يسمى البلازميد A فى هذه الحالة بالبلازميد القاطن المستقر resident plasmid.

٢ – إختار ١٠ مستعمرات بكتيرية على الأقل ثم إختبرها بغرض التعرف على وجود البلازميدين. أى إختبرها من حيث وجود البلازميدين.

٣ – لو أن البلازميد A غائب من جميع المستعمرات. يتم عمل حالة تزاوج أى تقابل سلالتين mating وفيها يكون البلازميد A فى الخلية الواهبة والبلازميد B فى الخلية المستقبلة. لو أن دخول أحد البلازميدين يستبعد أو يمنع دائماً الآخر، فإن البلازميدين يكونان غير متوافقين.

٤ – لو أن البلازميد القاطن المستقر resident plasmid يظل متواجد فى مستعمرات النسل. فإنه يجب إختبار المستعمرات المحتوية خلاياها لكلا البلازميدين (أى الخلية الواحدة بها بلازميدين A، B) وذلك بإختبار حالة الثبات وإختبار حالة التكاثر المستقل لكل بلازميد عن الآخر.

يتم إختبار حالة الثبات لكل بلازميد وذلك بالتواجد المستمر لدلالات أو معلمات لكلا البلازميدين بعد عدة أجيال من نموها على بيئة غير إنتخابية monselective media. التكاثر المستقل لكل من طرازى البلازميد يمكن التعرف عليه لو أن البلازميدين ينتقلان مستقلين عن بعضهما أثناء التزاوج.

لو أن البلازميدين A، B متواجدان بإستمرار أى يوجد ثبات فى تواجدهما وعلاوة على ذلك أن كلا منهما ينتقل مستقل عن الآخر أثناء التزاوج فإن هذين

البلازميدين متوافقين وبالتالى فإنهما يتبعان مجموعتين عدم توافق مختلفتين different incompatibility group. أتضح أن يمكن أن يوجد فى الخلية الواحدة سبعة بلازميدات مختلفة متوافقة. يعتقد أن تحديد عددها يكون راجع إلى حجم المكان المتاح لزيادة من دنا، أى أن المكان داخل الخلية ضيق ولا يتسع إلا لسبعة بلازميدات متوافقة ولا يتسع لزيادة. مثال ذلك أن الخلايا المحتوية على سبعة بلازميدات مختلفة متوافقة يكون زيادة فى كمية دنا تقدر بحوالى ٢٥%، وهذه الزيادة تكون ٢٥% علاوة على الكروموسوم.

كثير من البلازميدات يمكن نقلها بين بكتيريا القولون المختلفة enterobacteria ومثال ذلك إ. كولاى، *Shigella dysenteriae* وهذه البلازميدات يتم تصنيفها إلى ٢٥ مجموعة عدم توافق incompatibility groups. يمكن تصنيف البلازميدات أيضاً تبعاً لنوع الهديبات التى تكونها، يكون ذلك بوجود علاقات نسب بين أنواع الهديبات المختلفة يمكن إثباتها سيريولوجياً. توجد صفوف classes مختلفة للهديبات وهى F، شبه F (F-like)، I، وشبه I (I-like)، N وهكذا. فى حالة مجموعة Inc المثالية فإنها تحتوى على بلازميدات عديدة تشترك جميعها فى أن لها نظام تكاثر أى تكرار واحد وعلاوة على ذلك فإنها جميعها لها شكل عام للهديبات، وهكذا فإن صف الهديبات يستخدم بدرجة ما فى تسمية مجاميع Inc عدم توافق Inc groups. يوضح الجدول (جدول ١٩) ثمانية بكتيريات قولون فى مجاميع Inc مختلفة.

جدول ١٩: مجاميع عدم التوافق للبلازميدات Inc القابلة للنقل إلى إ. كولاى.

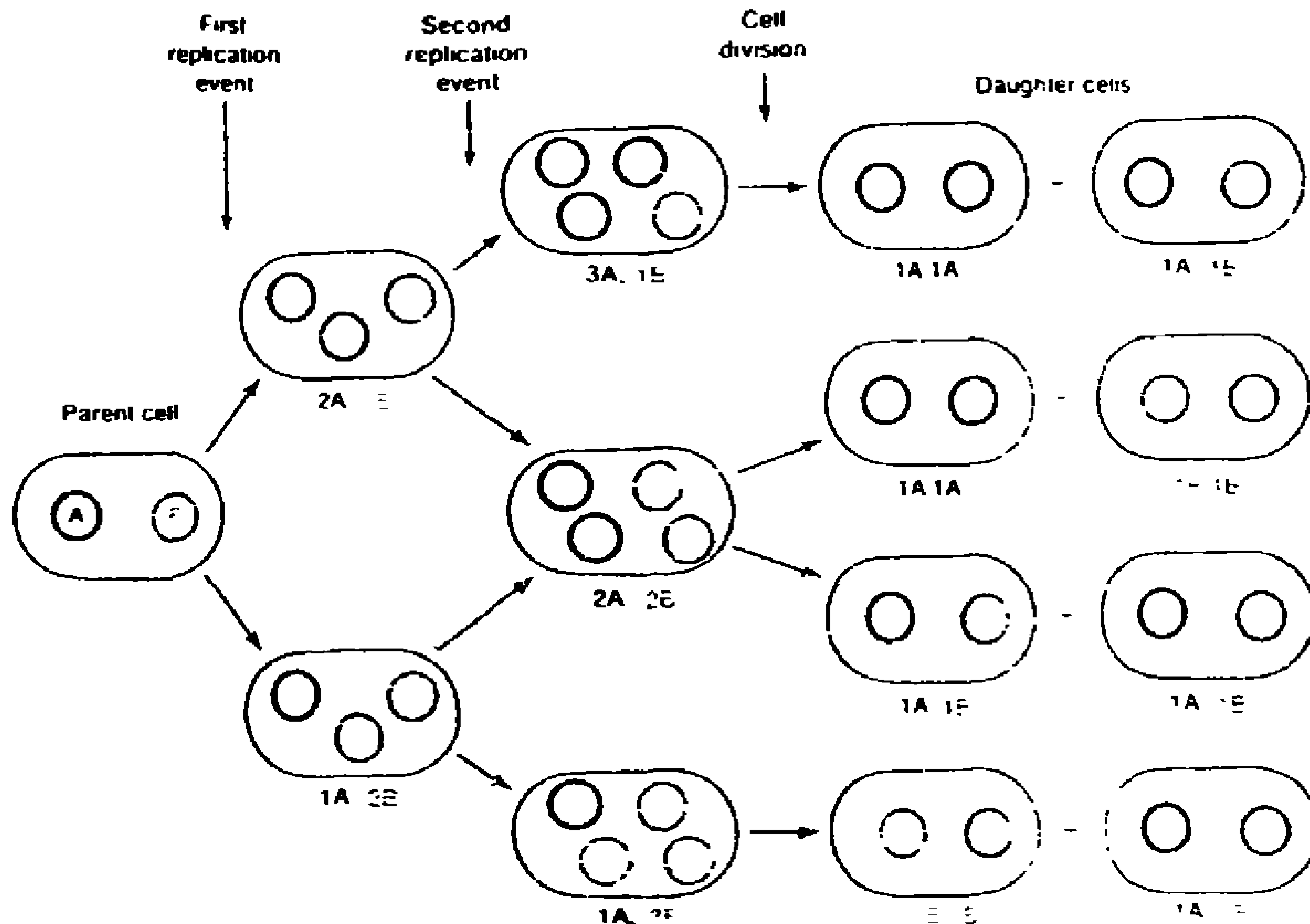
المجموعة	الهديب الجنسى	المجموعة	الهديب الجنسى
F_1	F	I1	I
F_{11}	F-like	I2	1-like
F_{111}	F-like	N	N
F_{IV}	F-like	P	RP_4

فى الجدول بلازميدات F كلها فى المجموعة F_1. بلازميدات R1، R100 فى المجموعة F_{11}. بلازميدات Col أساساً فى F_{11}، F_{111}، I1.

Some incompatibility groups of plasmids that are transmissible to *E. coli.**

Group	Sex pili	Group	Sex pili
F_1	F	I1	I
F_{11}	F-like	I2	1-like
F_{111}	F-like	N	N
F_{IV}	F-like	P	RP_4

*** The F plasmids are all in group F_{11}; R1 and R100, which are mentioned in the text, are in gaoup F_{11}; Col plasmids arte mainly in F_{11}, and I1.**



شكل ١٢٢: تكوين أربعة أزواج من خلايا البكتيريا البنوية **daughter cell** من خلية واحدة بها بلازميدين متوافقين A، B. أنظر الشرح.

تثبيط تكاثر أى تكرار أى تضاعف البلازميدات بواسطة الأكريدينات
Replication Inhibition by Acridines:

كثير من المركبات التى يمكن أن تتداخل بين قواعد دنا وخاصة الأكريدينات acridines ومنها البروفلافين proflavin وبرتقالى الأكريدين acridine orange وذلك فتحدث ظاهرة هامة وهى تثبيط تكاثر أى تكرار كثير من البلازميدات دون أن تؤثر على تضاعف دنا الكروموسوم البكتيرى. يمكن أن يسبب هذا التثبيط فقد البلازميدات وتسمى هذه الظاهرة شفاء الأكريدين acridine curing. يمكن إكتشاف هذه الظاهرة بسهولة عندما تحتوى البلازميدات على جينات من العائل. ويمكن توضيحها كما فى الشكل (شكل ١٢٣). لو أن مزرعة بكتيرية لها تركيب F *lac*$^+$ / *lac*$^-$ تم تنميتها على بيئة تحتوى برتقالى الأكريدين، فإن الخلايا تنمو وتنقسم. عدد خلايا *lac*+ فى عشيرة البكتيريا ثابت بإستمرار وعدد خلايا *lac*- يزداد. تفسير ذلك أنه عند وضع برتقالى الأكريدين فى البيئة فإن أغلب الخلايا تحتوى على نسختين من F' *lac*. بعد جيل واحد فإن كل خلية تحتوى على نسخة واحدة من F' *lac* لأن تكاثر البلازميدات تم تثبيطه. ولذلك فى إنقسام الخلية التالى يوجد بلازميد واحد فقط لكل خليتين بنويتين ولذلك فإن نصف عدد الخلايا البنوية لن يحتوى على بلازميد. ولذلك فإن شفاء الأكريدين يكون مفيد فى عزل سلالات من البكتيريا خالية من البلازميدات.

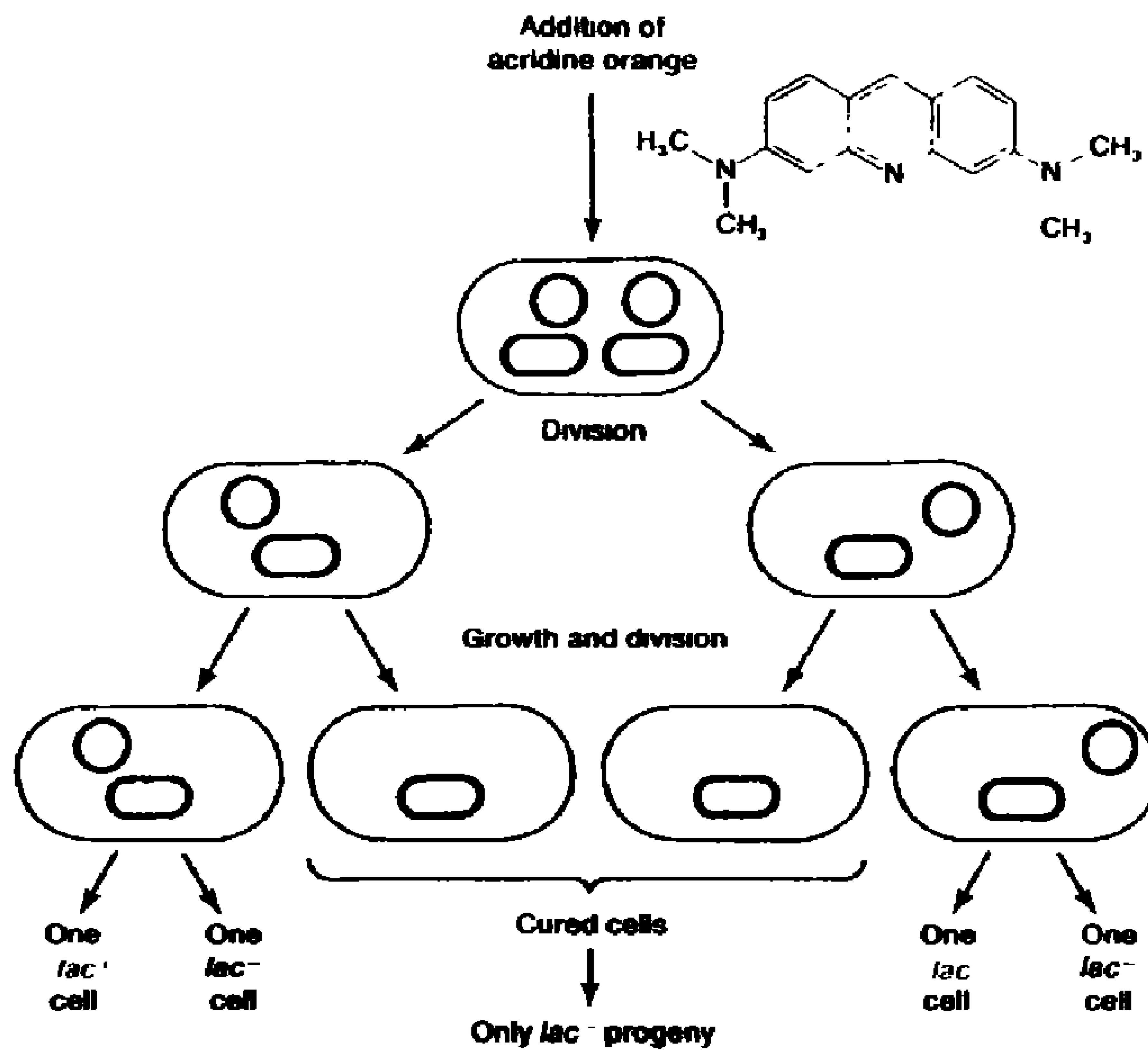
من عيوب آلية شفاء الأكريدين أن هذه الآلية تعمل فى مدى ضيق جداً من تركيز الأكريدين، وحيث أن الزيادة فى الأكريدين. تسبب تثبيط تضاعف الكروموسوم والعكس صحيح فى حالة التركيزات القليلة حيث أنها لا تؤثر على تكاثر البلازميدات. وغير معروف السبب لماذا يتأثر تكاثر البلازميد ويصبح حساس للأكريدين ولا يتأثر الكروموسوم بذلك. يعتمد شفاء الأكريدين على pH البيئة بدرجة كبيرة فإن pH المثالى هو ٧,٦ أما pH ٧ و ٨ فهما يمنعان حدوث شفاء الأكريدين. غير معروف أيضاً لماذ لا تتأثر بعض البلازميدات بالأكريدينات.

يمكن عمل الشفاء لسلالات تحتوى بلازميدات مثل سلالات عديدة من F+ بطرق أخرى غير الأكريدينات وهى تعرض الخلايا لدرجة حرارة ٤٥ مئوية مع وجود تركيزات منخفضة من detergents أو تركيزات منخفضة جداً من مضادات حيوية بحيث أنها لا تؤثر على نمو الخلية ولكنها تسبب الشفاء أى عدم وجود بلازميدات فى الخلية.

تجزييء البلازميد عند إنقسام الخلية

Partitioning of Plasmids at Cell Division

مجموعة من التجارب توضح أنه فى حالة البلازميدات قليلة النسخ low-copy-number plasmids فإن تجزييء البلازميدات وتوزيعها فى خلايا البكتيريا البنوية أثناء إنقسام الخلية يتم تنظيمه بكفاءة عالية. لو أن خلية على وشك الإنقسام تحتوى نسختين من البلازميد كما هو الحال فى البلازميدات F.



شكل ١٢٣ : شفاء خلية محتوية على F' lac^+ (يمثل بدائرة فى الشكل) بنموها على بيئة تحتوى برتقالى الأكريدين.

فإن كل خلية بنوية تحتوى على نسخة واحدة. لو أن توزيع نسختى البلازميد يكون عشوائى فى الخلايا فإن كمية الخلايا التى ينقصها البلازميد فى العشيرة أى الخالية من البلازميد يكون تبعاً لتوزيع بواسون Poisson distribution هى ٣٧% من الخلايا. مثلاً فى حالة خلية F' *lac*+/ *lac*- فإن إنعزال الخلايا -*lac* تحدث بنسبة حوالى ١ لكل ١٠٤ خلية لكل جيل، وعامة تكون هذه النسبة هى النسبة المثالية فى حالة فقد البلازميد من الخلية فى حالة البلازميدات قليلة النسخ أو العدد. من ذلك يتضح أنه توجد دلائل على وجود نظام وراثى محدد والذى ينظم عملية تجزيىء وتوزيع البلازميدين على الخليتين البنويتين وأن ذلك لا يحدث عشوائياً.

ومما يثبت الجملة السابقة أنه تم عزل طفرة فى البلازميد F والتى تزيد من إنعزال عدد الخلايا الخالية من البلازميدات بدرجة كبيرة وتصبح نسبة هذه الخلايا تماثل النسبة المتوقعة من التوزيع العشوائى للبلازميدات random partition. أمكن التعرف على نظامين متميزين two distinct systems فى الخلايا المحتية على بلازميدات قليلة العدد والتى تمنع إنعزال خلايا خالية من البلازميدات وأحد هذين النظامين يسمى par والنظام الثانى يسمى *ccd* أى إختصار control of cell division وهذا النظام يثبط إنقسام الخلايا المحتوية على نسخة واحدة فقط من البلازميد F.

أصبح من الواضح أن الخلايا ذات البلازميدات قليلة النسخ أو العدد لها نظـــام معين يتحكم ويمنع إنعزال عدد كبير من الخلايا من البلازميـــدات. هـــذا النظـــام المعين لا تحتاج إليه الخلايا ذات البلازميدات كثيرة النسخ أو العدد، ولذلك فـــإن توزيع البلازميدات فى هذه الحالة فى الخلايا البنوية يمكن أن يكون عشوائياً فى بعض الحالات. مثال ذلك أن إنعزال البلازميد ColE1 يحدث بنسبة حـــوالى ١٠-٦ إلى ١٠-٥ لكل جيـــل، وهى نسبة تماثـــل تماماً النسبة المتوقعـــة عنـــد حـــدوث إنعزال عشوائى وتوزيع عشوائى للبلازميدات فى خلية تحتوى من ٢٠ إلـــى ٣٠ بلازميد.

ومما يثبت ذلك أيضاً أنه فى حالة وجود سلالة من ColE1 بها بلازميدات قليلة وعددها ٢ أو ٣ لكل خلية وهذه السلالة موجودة فعلاً نتيجة طفرة وتسمى السلالة الطفرة الحساسة لدرجة الحرارة أثناء التكرار ColE1 temperature-sensitive replication mutant فقد وجد أن إنعزال الخلايا الخالية من البلازميد يكون بنسبة ٠,٢ لكل جيل، وهذا يوضح أن هذه البلازميدات لا تمتلك النظام par.

خواص بلازميدات بكتيرية خاصة

Properties of Particular Bacterial Plasmids

بعض البلازميدات الخاصة لها خواص فريدة ولذلك فإن لها إستعمالات هامة فى وراثة البكتيريا وأيضاً فى الهندسة الوراثية. قليل من هذه البلازميدات سيتم شرحه.

١ – البلازميدات F Plasmids F:

صفة أو خاصية هامة للبلازميدات F وهى قدرتها على أن تلتحم وتكمل الكروموسوم البكتيرى لينتج خلية Hfr. إلتحام وتكامل البلازميد مع الكروموسوم يكون تبادل عكسى reciprocal exchange ومشابه لما يحدث من إلتحام وتكامل الفاج لامدا λ مع الكروموسوم البكتيرى. الفاج لامدا يكون lysogen مع البكتيريا. الإلتحام والتكامل فى البلازميد F مع كرموسوم البكتيريا إ. كولاى يختلف عن الإلتحام والتكامل مع الفاج لامدا، حيث أنه بوجد مواقع تبادل exchange sites عديدة فى البلازميد F وعديد من مواقع التبادل على الكروموسوم البكتيرى ولذلك يمكن أن يحدث التكامل والإلتحام فى مواقع عديدة. يوجد ٢٠ موقع رئيسى major sites على الكرموسوم وحوالى مائة موقع تحت رئيسى minor sites على الكروموسوم أيضاً معروفة ومحددة. مدى التجاذب بين F وهذه المواقع غير

متساو ويختلف بإختلاف الموقع، فالبعض له جاذبية للبلازميد F أكثر من بعض المواقع الأخرى.

إنفصال أى قطع Fexcision F عن الكروموسوم يمكن أن يحدث، ولو أن ذلك نادر تماماً (يحدث الإنفصال، على أى حال، بتكرارية مرتفعة فى بعض المواقع عنه فى بعض مواقع أخرى). عادة تكون عملية القطع أى الإنفصال غير كاملة imperfect excision، حيث يحدث قطع عند أحد الطرفين للبلازميد F المتكامل والقطع الثانى يكون فى دنا الكروموسوم القريب من الطرف الثانى للبلازميد المتكامل. فى هذه الحالة فإن البلازميدات F المنفصلة أى الجديدة تحتوى على جينات كروموسومية. هذا القطع الشاذ aberrant excision يكون هو أصل نشأ البلازميدات F^{I}. توجد طرق وراثية تستخدم لعزل سلالات بكتيرية تحتوى على بلازميد F^{I}.

تكامل F مع بعض الطفرات البكتيرية والتى فيها عيوب فى تضاعف أى تكرار دنا ينتج عنها ظاهرة تسمى الكبح التكاملى integrative suppression. يستخدم F بروتينات عديدة خاصة بتضاعف البكتيريا إ. كولاى ولكنها لا تحتاج ناتج الجين البكتيرى Agene product dna A dna وهذا الناتج يكون ضرورى لبدأ تضاعف دنا الكروموسوم.

وهكذا لو أن F توجد على هيئة بلازميد حر فى طفرة حساسة للحرارة temperetare sensitive من البكتيريا إ. كولاى *dna* A(Ts) *E. coli.* Mutant dna A (Ts) وأرتفعت درجة الحرارة إلى ٤٢ درجة مئوية (هذه الدرجة من الحرارة توقف نشاط بروتين الطفرة the mutant Dna Aprotein Dna A) فإن بداية تضاعف الكروموسوم لم تعد ممكنة ولكن بالرغم من ذلك فإن F يتضاعف أى يتكاثر ويظل محتفظ بهذه الصفة. العكس من ذلك يحدث عندما يلتحم F مع الكروموسوم فى السلالة الطفرة *dna* A(Ts) فإن الكروموسوم يمكنه أن يتضاعف

باستمرار إلى مالا نهاية فى وجود درجة الحرارة المرتفعة السابق ذكرها. التضاعف أى التكرار لا يبدأ فى هذه الحالة عند أصل ومنشأ التكرار أى التضاعف للبكتيريا إ. كولاى ولكنه يبدأ عن الموقع *ori* V الخاص بتضاعف وتكرار F. وهكذا فإن تكامل F مع الكروموسوم يكبح الشكل الظاهرى للطفرة الحساسة للحرارة *dna* A(Ts) وذلك بتواجد منشأ للتضاعف أو التكرار مستقل عن ذلك الخاص بالتركيب DnaA أى غير معتمد على التركيب DnaA.

By providing a DnaA independent replication origin

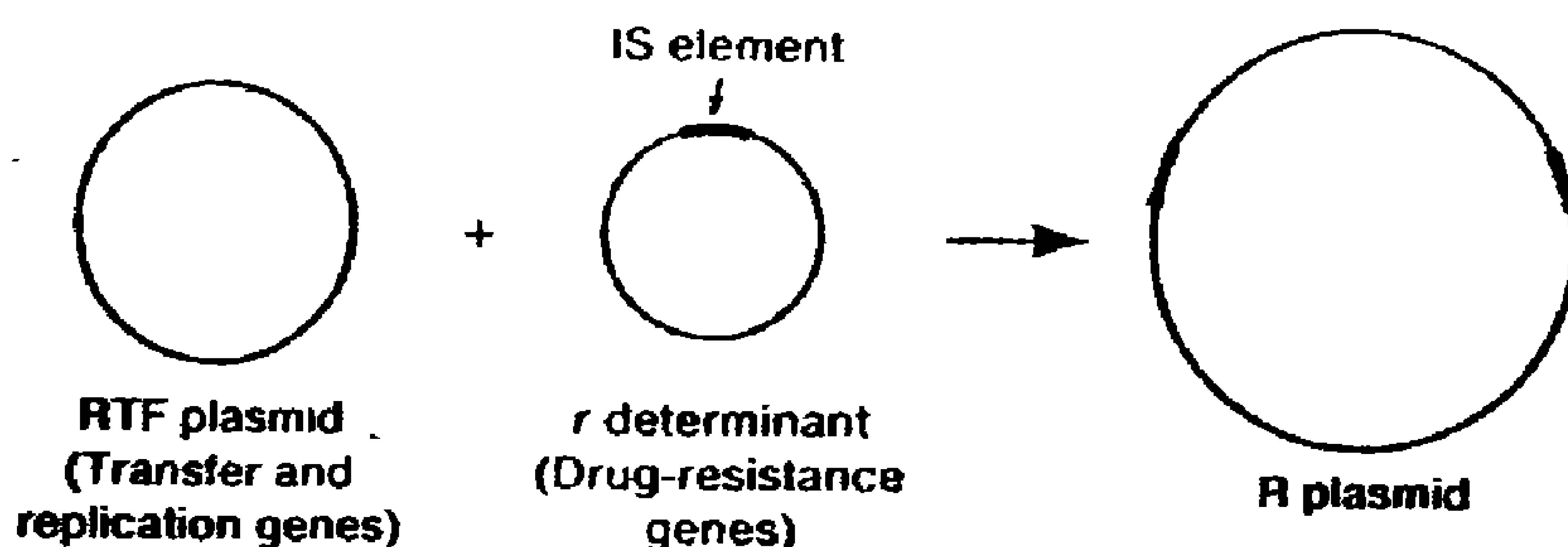
الإنتخاب فى أو من أعداد كبيرة screening من الخلايا لحالة الكبح التكاملى هو أحد الطرق لعزل سلالة بكتيرية فيها F فى حالة تكامل مع الكروموسوم. مثال ذلك أن السلالة البكتيرية F^{I} *lac*$^{+}$/Str^{s} يمكن أن تتزاوج مع السلالة *lac*$^{-}$ dnaA(Ts) Str^{r} ثم يتم إنتخاب خلايا بكتيرية *lac*$^{+}$ Str^{r} وذلك بتنميتها على بيئة الحد الأدنى لاكتوز آجار المحتوية على ستربتوميسين فى درجة حرارة ٤٢ درجة مئوية. جميع المستعمرات الحية النامية لابد أن تحتوى على الجزء المكمل أو المتكامل F *lac*. كل واحد من هذه المستعمرت يكون Hfr.

٢ – البلازميدات المقاومة للعقاقير Drug-resistance plasmids:

البلازميدات الخاصة بمقاومة العقاقير والتى تسمى R تم عزلها من البكتيريا *S. dysenteriae* أثناء موجه مفاجئة عارمة من الدوسنطاريا فى اليابان وقد وجدت أيضاً فى البكتيريا إ. كولاى وبكتيريات أخرى كثيرة. البلازميدات R تكسب الخلية الحاوية لها مقاومة لعديد من المضادات الحيوية الفطرية والبكتيرية وعادة تكون قابلة للإنتقال ذاتياً. أغلب البلازميدات R تتكون من قطعتين أى جزءين من دنا معديتين two contiguous segments (شكل ١٢٤). أحد هاتين القطعتين تسمى النقل المقاوم resistance transfer factor (RTF) وهى تحمل جينات تنظم عملية تكاثر أى تضاعف دنا وأيضاً عدد النسخ وأيضاً نقل الجين transfer genes

وأحياناً تحمل جين مقاومة للتتراسيكلين (Tet). القطعة الأخرى أحياناً المحدد لـ Rdeterminant R مختلفة فى الحجم أى تختلف فى أحجامها وتحمل جينات أخرى لمقاومة مضادات حيوية أخرى. تحمل البلازميدات R جينات مقاومة الأمبيسللين ampicillin (Amp) وكلورامفينكول chloramphenicol (Cam) وستربتوميسين streptomycin (Str) وكاناميسين kanamycin (Kan) وسلفون أميد sulfonamide (Sul) فى مجموعة من التباديل والتوافيق.

توجد بلازميدات صغيرة مقاومة للعقاقير ولكن ينقصها القدرة على الإنتقال ولكنها لا زالت تحتوى الجين Tet، وأحد هذه البلازميدات هو pSC101 والذى يستخدم بكثره فى الهندسة الوراثية. قطعتى أى جزيىء بلازميد R تذكرنا بحالة البلازميدات F^{l} ولكن يوجد إختلاف رئيسى بينهما وهو أن جينات المقاومة للمضادات الحيوية لا يتم إكتسابها بواسطة حدوث تكامل مع الجزء RTF ثم حدوث الإنفصال الشاذ aherrant excision بنفس طريقة البلازميدات F^{l} أى أنه لا يحدث تكامل لهذه الجينات مع الكروموسوم كما فى البلازميدات F^{l} ولكنها يتم إكتسابها بواسطة المتنقلات transposons والتى تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية. أى أن الإكتساب فى الحالة الأخيرة عن طريق المتنقلات.



شكل ١٢٤: مكونات البلازميد R.

وهكذا يوجد فرق رئيسى بين كيفية إنتقال وتكامل البلازميدات F^{l} وكيفية إنتقال وتكامل البلازميدات R.

الأدلة على تكوين البلازميد R من جزئين أى قطعتين وهما الجزءين RTF والجزء الثانى المكون R أى R component، المحدد R R-determinant تم التعرف عليها بكل من التجارب الطبيعية والوراثية. فصل دنا المعزول من مزارع بكتيرية لبعض السلالات المحتوية على البلازميد R، وضح حقيقة هامة وهى وجود ثلاثة أحجام من جزئيات دنا حلقية. وجد أن طول الأكبر منها عبارة عن مجموع طول الأثنين الآخرين. أوضحت الدراسات الوراثية للبلازميدات R حاملة المعلمات أى الدلالات أى جينات مقاومة للكورامفينكول (Cam) والستروبتوميسين (Str) والتتراسيكلين (Tet) والتى تنشأ من سلالات بكتيرية تحتوى على بلازميدات Tet^{r} Cam^{s} Str^{s} وسلالات أخرى تحتوى على سلالات $Tet^{s}Cam^{r}Str^{r}$ أو سلالات حساسة لجميع المضادات الحيوية. المعلمات أو الدلالات Cam^{r} و Str^{r} لا تتجزأ إطلاقاً أى لا ينفصلان إطلاقاً حيث يوجدان معاً دائماً أو لا يوجدان معاً أيضاً دائماً. أكثر من ذلك مزارع Tet^{r} Cam^{s} Str^{s} يمكن أن تنقل المعلم Tet^{r} ولكن السلالات Tet^{s} Cam^{r} Str^{r} لا يمكنها نقل أى معلم من هذه المعلمات. ولكن السلالات Tet^{r} Cam^{r} Str^{r} يمكنها نقل جميع الثلاثة معلمات أو المعلم Tet^{r} فقط. أثبتت الدراسات الفيزيائية أن حجم متوسط للبلازميد الحلقى موجود فى الحالة Tet^{r} Cam^{s} Str^{s} فى الخلايا وحجم صغير للبلازميد الحلقى موجود فى الحالة Tet^{s} Cam^{r} Str^{r} فى الخلايا. يتضح من التجارب السابقة أن المعلم Tet^{r} يكون مستقر فى بلازميد ذاتى الإنتقال وهو RTF فى أحد الجانبين. وأنه فى بلازميد آخر غير قابل للإنتقال (الوحدة أو المكون Runit R) فإنه يحمل المعلمات أو الدلالتين Str^{r} و Cam^{r}. وهكذا فإن البلازميد R الكبير يمكن أن يكون نتيجة لإلتحام البلازميد RTF والبلازميد المسمى المحدد أو الوحدة أو المكون Runit R أو Rdeterminent.

ملاحظة هامة وحساسة: وهى أن بعض السلالات وفى وجود بعض البلازميدات فإنه يتكون البلازميد الكبير R أى البلازميد المركب R (Composite R) وهو يتكون من إلتحام R مع RTF ويسمى RTF-R composite plasmid ولكن هذا البلازميد المركب يكون غير مستقر حيث ينفصل مرة أخرى مكوناً RTF وأيضاً الوحدة R. ووهكذا فإن السلالات المحتوية على RTF والوحدات R يتكون منها عادة فى بعض الخلايا البلازميد الكبير أى المركب a composite plasmid. زهذه البلازميدات السابق ذكرها يمكن أن تتحد ويمكن أن تنفصل associate and dissociate، وعادة تكون فى حالة إتزان. هذا الإتزان بين الحالتين يعطى تكبير للجين فى حالة الخلايا الحاملة للبلازميد Tet^r Cam^r Str^r. هذه الخلايا الأخيرة على التركيزات المرتفعة جداً من Cam أو Str فإن هذه الخلايا تزداد مقاومتها لهذه التركيزات لأنها تكتسب نسخ عديدة multiple copies أو المحدد R ويكون نتيجة ذلك زيادة حجم البلازميد عن المعتاد. هذا التكبير فى البلازميد لا يحدث فى وجود تركيزات كبيرة من Tet. لا يسبب المضاد الحيوى تكبير البلازميد بطريقة مباشرة ولكن توضيح ذلك أنه فى المزرعة البكتيرية يوجد عدد نادر جداً من الخلايا يكون فيها عدد وحدات أو محددات R متضاعف duplicated، وهذه الأخيرة تعتبر طفرات ويحدث لها إنتخاب نتيجة لنموها المستمر على البيئة الزائدة التركيز من Cam أو Str وذلك نتيجة لسرعة نمو وتكاثر هذه الخلايا المحتوية على البلازميدات الطفرة بدرجة كبيرة جداً عن الخلايا الأخرى ولذلك تسود. هذه الحالة من تكبير الجين تكون غير ثابتة لأنه لو تم تنمية هذه الخلايا مرة أخرى على بيئة خالية من المضادات الحيوية ولذلك فإن الخلايا ستنمو بدون إنتخاب للمضاد الحيوى لعدة أجيال، فإن البلازميد سيعود لحجم الطبيعى مرة أخرى أى يحدث له إنفصال dissociation. الإلتحام والإنفصال للبلازميدات وتكبير الجين يحدث نتيجة للإتحام بين association and dissociation القواعد المتتابعة الشائعة فى دنا الخاص بـــ RTF وأيضاً الخاص بـــ R ومثال

ذلك الشظية 1S (1S element). الإلتحام يكون نتيجة إعادة صياغة أى تزاوج recombination شظايا 1S فى حلقات مختلفة من البلازميدات. والإنفصال يكون عملية عكسية لعملية التزاوج أى إعادة الصياغة بين شيظتين فى حلقة واحدة.

توجد مجموعة شيقة من البلازميدات R ومثال ذلك شبيه F للبلازميدات (F-like R plasmids) وهى تشمل البلازميدات R1، R6، R100. فى الخلايا المحتوية كل من F وأحد هذه البلازميدات فإن البلازميدات R تسبب تثبيط الخصوبة لــ F. بإستخدام طريقة التحليل للمجموعات المكملة complementation anslysis وضحت أن البلازميدات R شبيهة F تحتوى على أغلب الجينات *Ftra*.

الفحص بالمجهر الإلكترونى للتزاوج الغير متماثل الطول heteroduplexes المتكون بين البلازميد F والبلازميد R شبيه F وضح تماثل وتوافق شديد فى مواقع النقل transfer regions. التحليل التفصيلى لهذه heteroduplexes أثبتت أن البلازميد R شبيه F يتكون من قطعة كبيرة أى شظية كبيرة من البلازميد F مرتبطة مع محدد R مثالى. لوحظ أيضاً عديد من الإنقلابات والنقص والإستبدال فى الجزيىء F من البلازميد R. يوضح ذلك أن البلازميدين يحتمل أنهما يكونان قد نشئا من أصل واحد من أزمنة أو عصور أو أحقاب جيولوجية قديمة.

تعتبر البلازميدات ذات أهمية كبيرة فى الطب لأنها يمكن أن تنتقل بين البكتيريا التى تسبب أمراض وأوبئة هامة للإنسان، مثال ذلك البكتيريا *S. dysenteriae* والبكتيريا *S. typhimurium*. وأيضاً سلالات البكتيريا التى تسبب تلوث وإصابة فى المستشفيات مثل عديد من بكتيريا القولون مثل *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*. فى الحقيقة، أصبح من الواضح أنه منذ بداية عصر المضادات الحيوية فإن البلازميدات R إزدادت بدرجة كبيرة فى الطبيعة. مثال ذلك، أن البنسلين أستعمل فى بداية الأربعينات. فى سنة ١٩٤٦ فإن ١٤% من سلالات *S. aureus* المعزولة من المستشفيات كانت مقاومة للبنسلين Pen^r. ثم أصبحت ٣٨% فى عام ١٩٤٧ثم ٥٩% فى عام ١٩٦٩ ثم

تقريباً ١٠٠% فى السبعينيات. غالبية هذه السلالات المقاومة إما أن تحمل بلازميد R أو تحتوى جين Pen^r فى البلازميد R. إنتقال البكتيريا التى تحمل البلازميدات R شائع الحدوث أيضاً من حيوانات المزرعة إلى الإنسان. البلازميدات R شائعة الوجود وقوية فى حيوانات المزرعة نتيجة الإستعمال المكثف للبنسلين والتتراسيكلين فى غذاء الحيوان (إستخدام تركيز منخفض من المضادات الحيوية فى تغذية الحيوان والدواجن تؤدى إلى زيادة وسرعة فى نمو الحيوان ولذلك يكون مفيد إقتصادياً). مثال ذلك أن الدواجن تتلوث بكثرة بواسطة البكتيريا إ. كولاى والبكتيريا *S. typhimurium* والتى تسكن وتستوطن أمعاء الإنسان. إستخدام اللحم قبل الطهى يعتبر طريق عام للإنتقال للإنسان فإنه فى أثناء غسيل الدواجن وتنظيفها وتقطيعها بأدوات المطبخ فإن البكتيريا تنتقل من اللحم إلى أدوات المطبـــخ وأسطح المطبخ وبالتالى تنتقل إلى الإنســـان. وحيث أن البكتيريا مقاومة لعديد من المضادات الحيوية، فإن المضادات الحيوية المستعملة بكثرة فى حالة إصابات *S. typhimurium* أصبحت غير فعالة. تزداد الأمـــور سوء، حيث أن العلاج بالمضادات الحيويـــة ذات المدى الواســـع تقتل بعض البكتيريا العادية فى العائل والتى قد تكون مفيدة وتسمح للبكتيريا الممرضة أن تزداد أكثر وبذلك تزداد وتشتد الإصابة. وفى هذا الصدد فإن كثير من أمراض الإنسان أصبحت شديدة الخطورة مرة أخرى ومثال ذلك مرض السل فى الإنسان وفى مقالة فى مجلة Time تناولت بالتفصيل هذا الموضوع من الناحية clinical وفيما يلى ملخص لهذه المقالة. أنـــه فى الولايات المتحدة الأمريكية تزداد الإصابـــة والموت بالسل عن ذى قبـــل إذ أتضـــح تكون سلالات من بكتيريا السل *Mycobacterium tuberclosis* تقاوم جميع المضادات الحيوية حتى الحديثة منها وفى هذا خطورة شديدة للمرض. كما أصبح تلوث المستشفيات بهذه البكتيريا محتمـــل فى بعض الحالات. وأن المرضـــى بعض منهم يشفى والبعض الآخر لا يشفى نتيجة وجـــود هذه السلالان المقاومة من البكتيريا ولذلك أصبح من المعـــروف أن المريـــض يستمر فى علاجـــه لمدة سنة وإذا لم يشفى فى

خلال هذه المدة أو فى نهايتها فإن موته بمرض السل محتمل الحدوث بدرجة كبيرة.

٣ – البلازميدات السامة للبكتيريا Colicinogenic plasmids :

البلازميدات Col عبارة عن بلازميدات البكتيريا إ. كولاى قادرة على إنتاج كوليسينات colicins. الكوليسينات عبارة عن بروتينات تمنع نمو سلالات البكتيريا الخالية من البلازميد Col وهذه السلالات الأخيرة تكون حساسة للكوليسينات. توجد مجموعة من البلازميدات توجد فى صف واحد من الصفوف الخاصة بالبلازميدات، وهذه البلازميدات فى هذا الصف تسمى البلازميدات المنتجة للبكترويوسينات bacteriocinogenic bacteria. هذه البلازميدات تنتج البكترويوسينات فى أنواع عديدة من البكتيريا وأيضاً فى أجناس عديدة. البكترويوسينات عبارة عن مركبات كثيرة وأحد هذه المركبات الكوليسينات colicins، وهى مركبات بروتينية تتفاعل مع البكتيريا الحساسة وتسبب تثبيط واحد أو أكثر من العمليات الحيوية الضرورية مثل تضاعف أى تكاثر دنا وعمليات النسخ وعمليات الترجمة وعمليات التحول الغذائى للطاقة. توجد طرز أى أنواع من الكوليسينات كل منها يرمز له بحرف مثال ذلك كوليسين B وكل واحد من هذه الكوليسينات له طريقة خاصة أو آلية خاصة لتثبيط الخلايا الحساسة (جدول ٢٠).

جدول ٢٠: خواص بعض الكوليسينات.

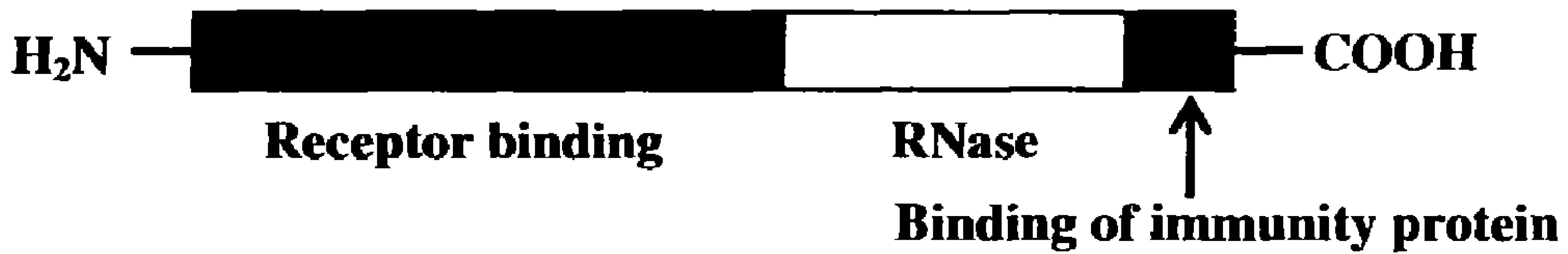
الكوليسين	التأثير
كوليسين b	ضرر للأغشية السيتوبلازمية
كوليسين B	ضرر للأغشية السيتوبلازمية
كوليسين E1	عدم إزدواجية الجهد الكيماوى الكهربائى خلال الغشاء
كوليسين K	عدم إزدواجية الجهد الكيماوى الكهربائى خلال الغشاء
كوليسين E2	تحليل دنا
كوليسين E3	يفصل أى يشق رنا الريبوسومى ١٦ S

أمكن التعرف على إنتاج الكوليسين بواسطة إختبار مماثل لذلك المستخدم فى التعرف على الفاج. توضع الخلية المنتجة للكوليسين على مسطح من خلايا بكتيرية حساسة على بيئة مناسبة، يثبط الكوليسين نمو البكتيريا القريبة منتجاً مساحة رائقة (منطقة رائقة) تعرف بإسم لاكونا lacuna (وهى تماثل plaques فى حالة الفاجات وتأثيرها على البكتيريا) تتكون فى الطبقة أى المساحة العكرة الناتجة من نمو البكتيريا الحساسة. يمكن أن يكون وجود بلازميد Col له قيمة أو فائدة لمعيشة العائل لأنها قد تكون قادرة على أن تنافس بكفاءة عالية الخلايا الحساسة للكوليسين الموجودة فى البيئة.

تقترح الدراسات على عديد من الكوليسينات النقية أنها نوعين وهى كوليسينات حقيقية true colicins وجزيئات فاج معيبة ناقصة defective phage particles. بعض الكوليسيمات عبارة عن بروتينات بسيطة. والنوع الآخر من الكوليسينات يشابه ذيل الفاج عند فحصها بالمجهر الإلكترونى، مثل هذه الكوليسينات يمكن أن تكون نواتج الجين من بقايا بروفاجات قديمة remnants of incient prophages. كيف يكون ذلك؟ يعتقد أن بروفاج ناقص أو بروفاج معيوب a defective prophage وأنه فقد جينات خاصة بالتكاثر وأيضاً الجينات الخاصة بتكوين رأس الفاج ولكن هذا الفاج الناقص أو المعيوب لازال يحتفظ ببعض الجينات والتى تشفر نظام مانع أى نظام كابح repressor system وأيضاً جينات تكون إنزيم محلل lysis enzyme وأيضاً تكون بروتينات الذيل. تشابه الكوليسينات الفاج فى أنها ترتبط بأماكن إستقبال خاصة specific receptor sites على جدار الخلية. دور بعض الجينات فى تخليق الكوليسينات يتم تثبيطه طبيعياً ولكن يمكن ظهوره بالمعاملة ببعض العوامل الضارة المخربة لدنا مثل الأشعة فوق البنفسجية.

فى كثير من الأحوال، تكون الكوليسينات غير فعالة ضد خلية تحتوى بلازميد Col ويكون قريب فى صلته بالبكتيريا أى قاربة وراثية، تسمى هذه الحالة

بالمناعة immunity. فى كثير من الأحوال، تحدث المناعة بواسطة بروتين صغير الحجم مفرز وهذا يرتبط ببروتين الكوليسين الكبير الحجم. يمكن أن يسمى البروتين صغير الحجم ببروتين المناعة immunity protein. بروتين المناعة لا يهب فقط المناعة لخلايا Col^+ ولكنه أيضاً ضرورى لقتل الخلايا الحساسة الخالية من Col أى Col^-. مثال ذلك أن البروتين المسمى colicin cloacin DF 13 يتكون من ثلاثة مناطق (شكل ١٢٥)، منطقة إرتباط وأستقبال a receptor binding region ومنطقة خاصة بتخليق RNase ومنطقة خاصة للإلتحام ببروتين المناعة. القمة أو الطرف لمنطقة الإرتباط والأستقبال تكون كارهة للماء ومن المحتمل أن تتفاعل مع غشاء الخلية. قطعة أو منطقة الإرتباط الخاصة بالمناعة -immunity binding system لها شحنة سالبة شحنة قوية والتى تتعادل بواسة بروتين المناعة الموجب الشحنة. بعد الإلتصاق بالمستقبل receptor فإن الكوليسين ينشق is cleaved وتبقى منطقة N الطرفية خارج الخلية والقطعة RNase تدخل الخلية تاركة بروتين المناعة على سطح الخلية. ينشط RNase ويحلل رنا الموجود فى الريبوسومات وهكذا يقتل الخلايا الحساسة للكوليسين.



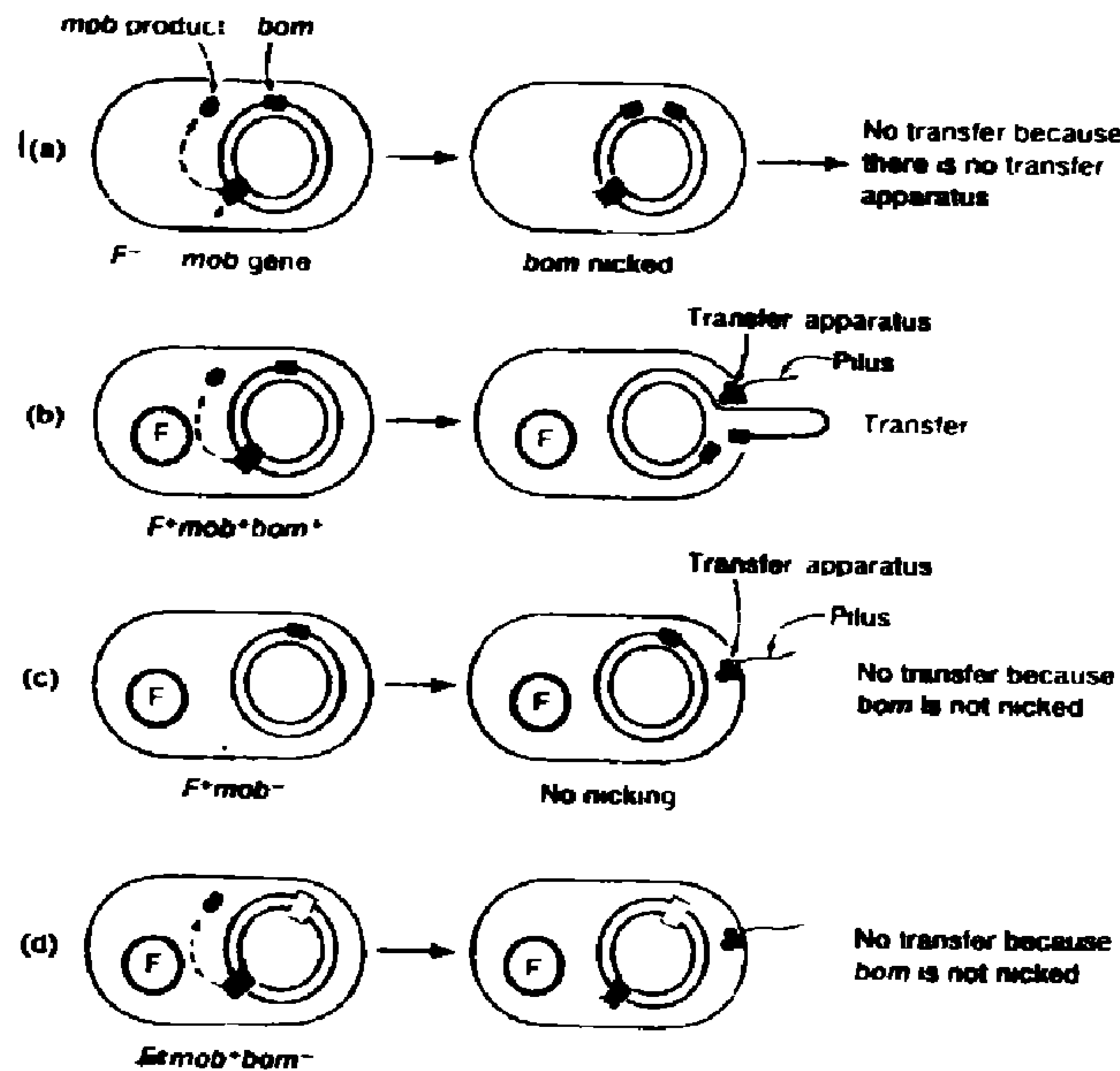
شكل ١٢٥: مناطق عديد الببتيدات (بروتين) Cloacin DF13.

بلازميدات Col تختلف كثيراً فى الحجم. هذه البلازميدات الصغيرة الحجم تكون غير قابلة للإنتقال ذاتياً والبلازميدات الكبيرة الحجم تكون قابلة للإنتقال ذاتياً -self transmissible. أفضل البلازميدات Col المدروسة هى Col E1 فهى تكون من تتابع للقواعد يتكون من ٦٦٤٦ زوج من القواعد المعروفة. يستخدم هذا البلازميد بكثرة فى البحوث الخاصة بإعادة الصياغة لدنا recombinant DNA

research. كثير من البلازميدات Col الكبيرة الحجم القابلة للإنتقال ذاتياً عبارة عن هجين بين بلازميد Col صغير وبلازميدات F أو F'.

يعتبر البلازميد ColE1 متحرك ذاتياً وكلنه غير قابل للتزاوج nonconjugative plasmid، وقد تم إثبات أن الإنتقال الذاتى يحتاج إلى جين أو جينات تشفر تخليق إنزيم نيوكلييز وقد وجد بالفعل أن الجين *mob* مسئول عن تخليق نيوكلييز. كما وجد أيضاً أن هذا البلازميد يحتوى على تتابع خاص من النيوكليوتيدات يسمى *bom* وهى إختصار الجملة basis of mobility وهذه المنطقة تحتوى على منطقة قطع cutting site. أمكن إثبات ذلك فى التجربة الآتية (شكل ١٢٦). توضح هذه التجربة أن يوجد بلازميدين متوافقين فى الخلية الواحدة وهما البلازميدين F، و ColE1. البلازميد F يمثل التزاوج ولكن البلازميد ColE1 ينقصه هذه الصفة ولكن البلازميد F يمكن أن يجعل ColE1 قابل للإنتقال. فى حالة (a) يوضح خلية بها البلازميد ColE1 وخالية من F أى F⁻. الجين *mob* يتم تكوين ناتج نشاطه أى وظيفته تكوين ناتج يسمى ناتج *mob* (*mob* product). وجد أن المركب الناتج *mob* يسبب قطع فى موقع الجين *bom* (ويسمى الموقع الذى ينقطع فيه هذا الجين بإسم *nic*). ونتيجة لذلك فإن ColE1 زائد الحلزنة من دنا يتحول إلى حلقة مقطوعة nicked circle. لا يحدث جركة وإنتقال لأن ColE1 ينقصه القدرة على تخليق أو تكوين هديبات ولذلك لا يحدث تزاوج فى أزواج. فى حالة (b) تحتوى الخلية على كل من البلازميد F والبلازميد ColE1. يسبب F تكوين الهديبات وتكوين أى تخليق جهاز النقل transfer apparatus. ولذلك يحدث حركة وإنتقال للبلازميد ColE1. طفرات فى الجين *mob* بحيث يصبح (*mob*⁻) فى ColE1 ويصبح البلازميد ColE1 غير قادر على الحركة. أوضحت الدراسات الوراثية أن الطفرة *mob* متنحية كما أوضحت الدراسات أن الجين *mob* يكون بروتين قابل للإنتشار. عند عزول هذا البلازميد المحتوى على الطفرة *mob* فإنه لا يكون فى حالة إسترخاء معقدة relaxation complex فشل F فى جعل ColE1 قابل للإنتقال

توضحه الحالة C. فى الحالة (c) فإن الهدبيات تتكون وجهاز النقل يتكون أيضاً ولكن لا يحدث قطع فى ColE1. وجدت طفرة أخرى فى ColE1 والتى لها الشكل الظاهرى Mob^- (*Mob^- phenotype*) ولكنها تمتلك الطفرة *cis*-inant، وهذه الطفرة الأخيرة تسبب نقص فى دنا ينتج عنه إزالة موقع الجين *bom* كلية وتماماً. يتكون بروتين *Mob* ولكن يفشل حدوث قطع فى دنا ولذلك لا يحدث إنتقال للبلازميد ColE1 كما فى (d).



شكل ١٢٦: إنتقال البلازميد ColE1 بواسطة البلازميد F (a) لا يحدث إنتقال لعدم وجدود جهاز الحركة (b) يحدث إنتقال لوجود جهاز الحركة والهدبيبات وقطع فى *bom* (c) لا يحدث إنتقال لعدم قطع *bom* بواسطة ناتج *mob* لأنه غير موجود لأن *mob^-* (d) لا يحدث إنتقال لعدم وجود قطع فى *bom* لعدم وجودها *bom^-*.

٣- بلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium*:

مرض التدرن التاجى الموجود فى كثير من النباتات ذوات الفلقتين يتسبب عن البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*. القدرة على تكوين التدرنات موجودة فى بلازميد يسمى Ti عند إصابة النبات، فإن بعض من البكتيريا تخترق النبات وتنمو

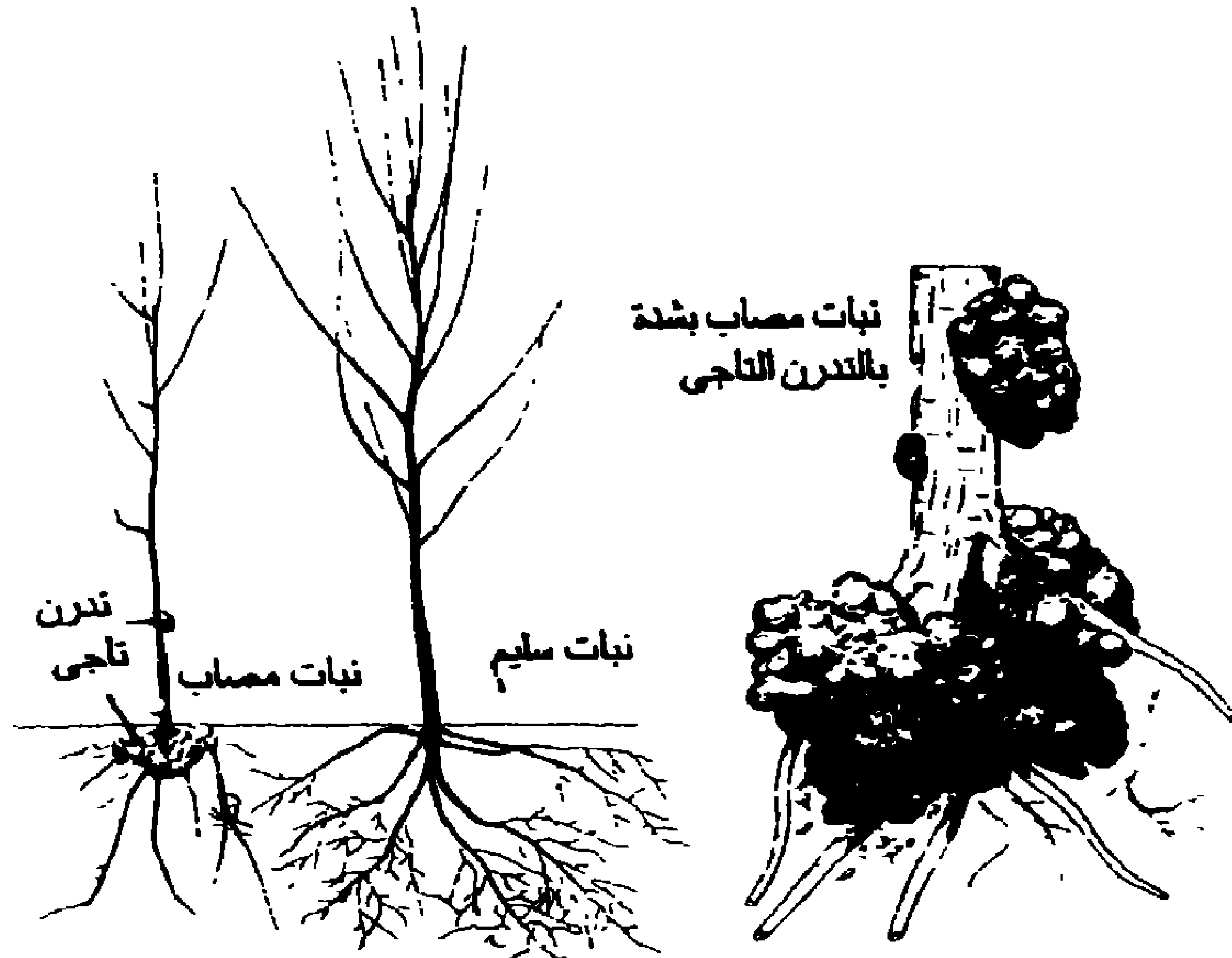
فى داخل الخلايا النبات وتتحلل فى الخلايا محررة دنا فى خلايا النبات. من هــذه النقطة أى عند هذه المرحلة لا تصبح البكتيريا ضرورية لتكوين الــورم. جــزء صغير من البلازميد Ti يسمى T-DNA أى T دنا يحتوى على جينات التضــاعف أى التكرار، تصبح متداخلة وملتحمة ومكملة لكروموسومات خلية النبــات. هــذا الجزء من البلازميد المكمل للكروموسوم يحور من عملية تنظــيم الهورمونـــات وتخليقها فى خلية النبات والتى تتحكم فى إنقسام الخلية، تسبب تحويل الخلية إلى خلية متدرنة tumor cell أى تشارك فى تكوين الورم. هذا البلازميد أصبح هــام فى تربية النبات لأن جينات معينة خاصة يمكن إدخالها فى البلازميد Ti بواسطة طرق دنا للإرتباط recombinant DNA techniques، وفى بعض الأحيان يمكن أن تصبح هذه الجينات جزء مكمل فى كروموسوم النبات، ولذلك فإنها تغير التركيب الوراثى والشكل الظاهرى فى النبات. أمكن إنتاج أصناف نباتات جديدة تحتــوى على صفات مرغوبة ومفيدة إقتصادياً، تم الحصول علهيا من أنواع بعيدة وغيــر قريبة من النبات المحور، وبذلك يمكن إنتاج أنواع من النبــات بهــذه الطريقــة. وفيما يلى شرح تفصيلى لذلك.

تعتبر البكتيريــا *Agrobacterium tumefaciens* مــن أهــم الكائنـــات الحيــة المستخدمة فى دراسة الهورمونات النباتية حيث أمكن إثبات وجود مناطق معينة على المادة النووية تتحكم فى إنتاج بعض الهرمونات النباتية.

نبذة عن البكتيريا
Agrobacterium tumefaciens

تسبب هذه البكتيريا مرض هام فى النبات وهو التــدرن التــاجى crown gall. ينتشر هذا المرض فى جميع أنحاء العالم. تصيب البكتيريا عوائل خشبية وعشبية كثيرة تشمّل مائة وأربعون جنس تتبع ستون عائلة. توجد على وجه الخصــوص على التفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية والعنب وعباد الشمس والورد.

يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفة وتتكون عادة تحت سطح التربة مباشرة وهى الجزء من ساق النبات الذى يعرف بالتاج ومنه أشتق أسم المرض. يمكن أن تظهر أعراض المرض على الجذور الرئيسية. يقل محصول النبات المصاب وقد يموت. يشابه المرض سرطان الإنسان والحيوان ولذلك فإن كيفية حدوثه تمت دراستها بالتفصيل ولكن أيضاً توجد إختلافات جوهرية فى الحالتين (شكل ١٢٧).



شكل ١٢٧: أعراض مرض التدرن التاجى.

حديثاً ونتيجة للدراسات المكثفة على هذه البكتيريا وهذا المرض. فقد أمكن إثبات أن البكتيريا فى تركيب أى تحور المادة الوراثية لخلايا النبات العائل حيث أنه يوجد جزء من بلازميد هذه البكتيريا ويعرف هذا البلازميد بإسم Ti Plasmid DNA ويعرف هذا الجزء بإسم T-DNA ويمكن لهذا الجزء أن ينتقل ويلتحم فى DNA الخلية ويصبح جزء من المادة الوراثية للخلية ويمكن أن يعبر express عن وظيفته أو وظائفه بكفاءة عالية فى خلية النبات. ولذلك فإنه من الممكن

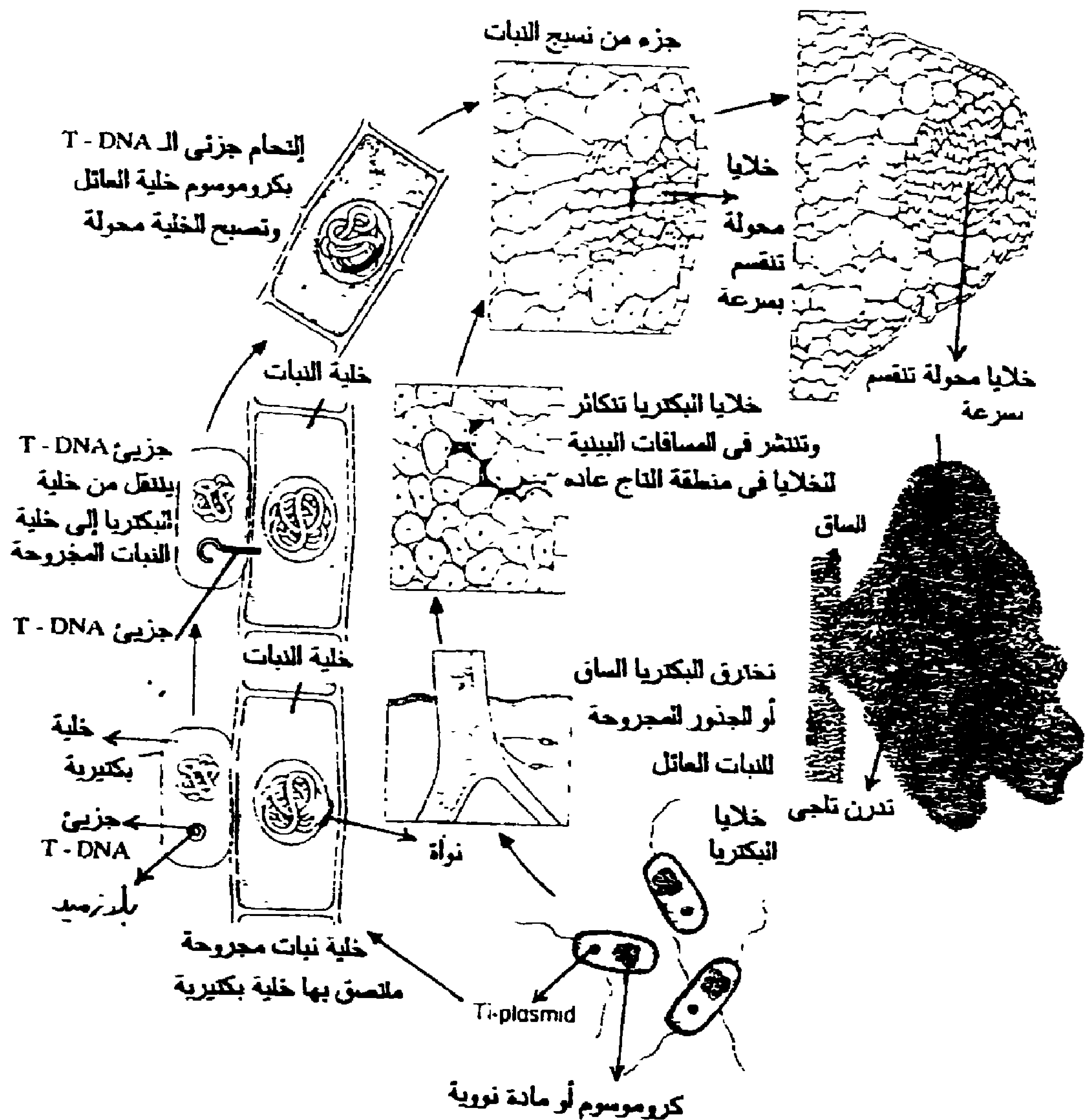
إستخلاص البلازميد بعد إدخال جينات جديدة إليه من نبات الفاصوليا. يتم إلتحام هذه الجينات أى أجزء من DNA الفاصوليا مع البلازميد فى خلايا البكتيريا *A. tumefaciens*. ثم يتم عمل تلقيح بهذه البكتيريا فى نبات آخر مثل عباد الشمس وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من المادة الوراثية لنبات عباد الشمس.

تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتيريا ويعتبر DNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA حديثاً يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عادية أو مهندسة وراثياً وذلك فى عدم وجود البكتيريا. يمكن الآن إزالة أجزاء من البلازميد المسئول عن تكوين الأورام فى النبات وتظل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعالة وقادرة على إظهار تأثيرها ولذلك فأنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتيريا تكون غير قادرة على إنتاج أورام فى النبات. تعتبر هذه البكتيريا مهندس وراثة طبيعى natural genetic engineer قادر على تحوير المادة الوراثية للنبات العائل وذلك بإدخال جزء من المادة الوراثية لهذه البكتيريا إلى كروموسومات النبات العائل. والآن تستخدم هذه البكتيريا على نطاق واسع لنقل جميع أنواع الجينات بين نباتات مختلفة متقاربة ومتباعدة وراثياً related and unrelated plants وأيضاً بين كائنات حية متباعدة بين الحشرات أو الفيروسات والنبات أى أنه يمكن نقل صفة من حشرة معينة إلى النبات عن طريق هذه البكتيريا (شكل ١٢٨). حشرة ذبابة النار ونبات التبغ والإشعاع أى الفلورة.

الأعراض المرضية لهذه البكتيريا على النبات:

تظهر أورام صغيرة على الساق أو الجذور بالقرب من سطح التربة فى البداية، وفى الأطوار الأولى تكون الأورام تقريباً كروية الشكل بيضاء أو لحمية اللون وطرية. وحيث أنه لكى تحدث الإصابة لابد من وجود جروح أى أن التدرن

أو الورم ينتج فى منطقة الجرح فإنه فى البداية لا يمكن تمييزه عن نسيج الكالس callus ولكن سرعة تكوين الورم تكون أكثر بكثير من سرعة تكـــوين الكـــالس. يكبر التدرن فى الحجم ويصبح سطحه ملتو ومتعرج. فى النهاية تصبح الأنسجة الخارجية للتدرن بنية سوداء أو سوداء نتيجة لموت وتحلل الأنســجة الســطحية للورم.



شكل ١٢٨ : دورة حياة البكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجى.

أحياناً لا يوجد خط فاصل واضح بين نسيج الورم وأنسجة النبات حيث يظهر الورم نتيجة لإنتفاخ غير منتظم الشكل فى الأنسجة ويحيط بالساق أو الجذر. عادة يكون الإنتفاخ خارجى وملاصق للجذر أو الساق عن طريق عنق ضيق من الأنسجة. وأحياناً يكون الورم أسفنجى القوام ويمكن أن ينفصل بسهولة عن الساق أو الجذر أو يتحلل أو ينفصل إلى أجزاء تسقط أو تتحلل. أحياناً أخرى يصبح الورم خشبى ويصبح درنى الشكل ويصل قطره إلى ٣٠ سم أو أكثر. بعض الأورام يمكن أن تتعفن جزئياً أو كلياً ويبدأ العفن من السطح ويتجه إلى داخل التدرن وذلك فى الخريف أو الشتاء ويتكون مرة أخرى فى نفس المكان فى الموسم التالى فى الربيع أو الصيف أى فى موسم النمو. أحياناً تتعفن أجزاء من الورم أو التدرن وتتحلل وتتكون أورام أخرى على الأجزاء المتبقية من الورم.

تتكون الأورام على الجذور والسيقان عادة عند سطح التربة ولكنها قد تتكون على بعد قد يصل متر ونصف من منطقة التاج للنبات وذلك فى بعض النباتات الزاحفة أو العشبية وقد تتكون على أفرع الأشجار أو بتلات الأزهار أو عروق الأوراق. عادة يكون ورم أو تدرن واحد فقط ولكن يمكن أن يزيد ويصبح عديد من الأورام متصلة على الجذر أو الساق أو كليهما على الفروع.

قد لا يؤثر المرض تأثير ضار واضح على النبات ولكن قد يسبب قصر النبات وقد ينتج أوراق صغيرة ذات لون أخضر باهت ويكون النبات قابل للتأثر بالظروف البيئية غير الملائمة والتى تؤثر على نموه وإنتاجيته مثل ضرر الشتاء winter injury.

صفات البكتيريا:

عصوية الشكل ذات عدد قليل من الأسواط محيط peritrichous يوجد بداخل خلايا البكتيريا للسلالات الممرضة بلازميد أو أكثر. يتكون البلازميد من DNA ثنائى الشريط أو الخيط، حلقى الشكل ووزنه الجزيئى يتراوح بين مائة إلى مائة

وأربعون مليون دالتون. يحمل أحد هذه البلازميدات جينات خاصة بتكوين التدرن أى الأورام ويسمى Ti plasmid وهى إختصار لكلمتين وهما منتج الأورام tumor-inducing. خلو البكتيريا من البلازميد Ti يجعلها غير ممرضة للنبات. كما أن المعاملة الحرارية للخلايا البكتيرية المحتوية على بلازميد Ti تفقدها هذا البلازميد ويصبح غير فعال وتصبح البكتيريا غير ممرضة للنبات أى تفقد القدرة على إصابة النبات. يحمل البلازميد Ti الجينات التى تحدد نوع العوائل النباتية التى يمكن أن تصيبها الخلايا البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد وأيضاً تحدد نوع الإصابة على النبات العائل حيث أنه توجد أنواع وحالات مختلفة من الإصابة سبق ذكرها وأهم خاصية لهذه السلالات من البكتيريا أنها قادرة على نقل جزء من DNA هذا البلازميد بسرعة وبكفاءة عالية إلى المادة الوراثية لخلايا النبات ولذلك تتحول خلايا النبات العادية إلى خلايا أورام ينتج عنها التدرن وذلك فى فترة وجيزة. عندما يكتمل تحول بعض خلايا النبات العادية إلى خلايا نشطة فى عمل الأورام فإن هذه الخلايا الأخيرة تنقسم وتنمو بطريقة غير طبيعية لتزيد أو تكون الأورام ويكون ذلك حتى فى عدم وجود البكتيريا حيث يصبح الأنقسام غير مرتبط بالبكتيريا.

عند نقل جزء من هذه الأورام والذى يحتوى على خلايا نشطة فى الأنقسام إلى بيئة معذية وقد تكون بيئة سائلة أو بيئة آجار فإن هذه الخلايا تكون نشطة فى الأنقسام فى عدم وجود هورمونات معينة تحتاجها الخلايا العادية على نفس هذه البيئة لكى تصبح قادرة على الأنقسام، أى أن الخلايا العادية تحتاج إلى وجود هورمونات معينة فى البيئة لكى تنقسم ونت هذه الهورمونات إندول حامض الخليك ولكن خلايا التدرن لا تحتاج إلى هذه الهورمونات على نفس البيئة. تخلق خلايا النبات المكونة للورم أى المحتوية على جزء من DNA بلازميد Ti مركبات كيماوية خاصة تسمى opines والتى يمكن أن تستعمل فقط بواسطة البكتيريا المحتوية على بلازميد Ti مناسب بينما الخلايا العادية غير

قادرة على تخليق هذه المركبات وحتى أستعمالها. وهذه حالـة طفيـل وراثـي genetic parasite حيث أن جزء من DNA بلازميد البكتيريا ينتقـل إلـى المـادة الوراثية لخلية النبات العائل وبذلك ينبه ويشجع الخلايا على تكوين مركبات معينة لازمة للبكتيريا وغير لازمة لخلايا النبات العائل ولا يكونها أصلاً أى أن يحـدث تغيير فى عمليات التحول الغذائى فى خلايا النبات لصالح البكتيريا وحيث تستفيد البكتيريا فى غذائها من هذه المركبات.

حدوث المرض:

تعيش البكتيريا فى الشتاء فى التربة وحيث يمكنها أن تعـيش كـذلك لعـدة سنوات ويكون نوع المعيشة رمية. عند نمو النبات العائل فى هذه التربة الملوثة بالبكتيريا فإنها تخترق الجذور أو السيقان بالقرب من سطح التربة ولابـد مـن وجود جروح حديثة نسبياً لكى تحدث عملية الأختراق وبالتالى إصـابة النبـات. تتكون هذه الجروح نتيجة للعمليات الزراعية والتطعيم والحشرات إلـخ. توجـد البكتيريا فى بداية الإصابة فى المسافات البينية بين خلايا النبات وتنشط الخلايـا المحيطة بها لكى تنقسم. يتكون نتيجة لذلك حلقات من الخلايا التى لها قدرة فائقة على الأنقسام بالمقارنة بالخلايا العادية وتظهر هذه الحلقات من الخلايا فى نسيج القشرة أو الكمبيوم تبعاً لدرجة عمق الجروح. تحتوى هذه الخلايا على نـواة أو أكثر. تنقسم هذه الخلايا بسرعة فائقة تسمى هذه الحالـة hyperplasia وتكـون خلايا غير متشكلة وغير متميزة فى تركيبها التشريحى وبعد حوالى عشرة أيـام إلى أسبوعين بعد التلقيح يظهر الورم ويمكن رؤيته بـالعين المجـردة. أمكـن للمؤلف عدوى نباتات صغيرة من عباد الشمس وبدء ظهور الورم بعد أربعة أيام. حيث أن الأنقسام السريع العشوائى للخلايا وأيضا كبر حجم الخلايا بطريقة غيـر منتظمة فإن التدرن أو الورم يزداد فى الحجم تدريجياً ويكون تدرن صغير. عادة تكون البكتيريا غير موجودة فى مركز التدرن أى أن هذا الجزء من الأنسجة خال من خلايا البكتيريا إلا أن الطبقة أو الجزء السطحى من التدرن يحتوى على خلايا

بكتيرية فى المسافات البينية للخلايا. فى هذه المرحلة تتميز بعض خلايا التدرن إلى أوعية خشبية وقصيبات ولكنها تكون غير متصلة بنسيج الخشب للنبات أو يكون إتصالها فى مناطق قليلة محددة بنسيج الخشب للنبات. عند كبر الورم فى الحجم فإنه يضغط على الأنسجة المحيطة به وأيضاً الأنسجة أسفله والتى تسبب سحق وتمزق لهذه الأنسجة فى النبات العائل. قد يحدث سحق لأوعية الخشب بواسطة التدرن وقد يسبب ذلك ضعف إنسياب الماء إلى أعلى فى الأوعية الخشبية وبذلك يقل إنسياب الماء إلى المجموع الخضرى قد يصل ذلك إلى ٢٠% فقط من الماء المنساب إلى المجموع الخضرى فى الحالة العادية.

لا تغطى التدرنات الملساء الصغيرة بنسيج البشرة ولذلك فإنها تهاجم بالحشرات أو الكائنات الحية الدقيقة الرمية. هذه الكائنات الأخيرة تسبب تلون الجزء السطحى من الورم باللون البنى أو الأسود كما قد تسبب تحلله. تحلل أو تمزق الجزء السطحى من الورم يسبب تحرر البكتيريا وسقوطها فى التربة والتى قد تحمل بمياه الرى أو الأمطار لتصيب نباتات جديدة.

عند كبر الأورام تصبح أحياناً خشبية وصلبة. تكوين الحزم الوعائية الغير كامل والغير مرتب فى الورم يكون غير فعال فى تأدية وظيفته ونتيجة لذلك فى بعض الحالات تكون الأورام غير قادرة على الحصول على الماء أو التغذية بدرجة كافية ولذلك يتوقف كبر التدرن فى الحجم ويحدث تحلل لبعض أجزاؤه ويحدث موت لبعض الأجزاء ثم تتحلل وتتلاشى هذه الأجزاء الميتة. فى بعض الحالات يضمر التدرن ولا يظهر تدرن جديد ولكن عادة يتبقى جزء حى من التدرن ويتكون منه أوام أخرى فى نفس الموسم أو فى الموسم التالى.

عند إصابة الأنسجة الغير بالغة والصغيرة السن وأيضاً الأنسجة التى لها درجة كبيرة من الأستطالة فإنه يتكون فى منطقة الإصابة ورم إبتدائى primary tumor وقد يتكون أسفل هذا الورم ولكن عادة يتكون أعلاه ورم آخر يسمى بالورم الثانوى أو التدرن الثانوى secondary tumor ويمكن أن يبعد هذا الورم

أو التدرن الثانوى عن الورم الإبتدائى لمسافة صغيرة أو متوسطة أو كبيرة حيث يمكن أن يظهر الورم أو التدرن الثانوى على فرع النبات. أحياناً تظهـر الأورام الثانوية على ندب الأوراق المتساقطة أو فى مكان الجروح الناتجة عـن عوامـل مختلفة أو حتى على أجزاء من الساق غير مجروحة ظاهريـاً أو علـى أعنـاق الأوراق وعلى العروق الوسطية أو العروق الكبيرة للأوراق. تبعد هـذه الأوراق المصابة عن الورم أو التدرن الإبتدائى عدة سـلاميات. بدايـة تكـوين التـدرن الثانوى تكون من نسيج خشب الحزم الوعائية. وهذه الأورام أو التدرنات الثانوية تكون دائماً خالية من البكتيريا المسببة للمرض. حيث أنه عند قطع هـذه الأورام وتعقيمها ووضعها على بيئة مناسبة فإنه لم يمكن عزل هذه البكتيريا وذلك دليل على أن هذه الأورام الثانوية خالية من البكتيريا. عند أخذ جزء مـن الـورم أو التدرن الثانوى وتطعيمه على نبات سليم فإنه يسبب تكون أورام علـى النبـات السليم وتكون هذه الأورام خالية من البكتيريا أيضاً ولكنها تشبه الأورام الإبتدائية فى شكلها ومظهرها وتركيبها.

يثبت ذلك من أن البكتيريا لها أهمية كبيرة فى بداية المرض فقط حيث أنهـا تسبب تأثير مهيج للخلايا والأنسجة **irritant effect** فى النبات المصـاب. وبعـد حدوث الإضطراب والهياج فى الخلايا فإنها لا تحتاج إلى البكتيريا لحدوث إنقسام الخلايا الغير منتظم والمسبب لتكوين التدرن حيث أن هذه الخلايا تصـبح قـادرة ذاتياً على إنتاج العامل المؤثر والذى يحدث هياج للخلايا لتصـبح قـادرة علـى الأنقسام بسرعة فائقة وبطريقة غير منتظمة وأيضاً بطريقة غير مـتحكم فيهـا **uncontrolled** ولذلك فإن البكتيريا لها أهميتها فقط فى بداية حدوث الورم ولكـن بعد ذلك يمكن للخلايا المكونة للورم أن تسبب هياج خلايـا أخـرى وأنقسـامها إنقسام زائد فى عدم وجود البكتيريا. بالرغم من وجود دراسات مكثفـة لمعرفـة طبيعة المسبب لهياج **irritant** خلايا النبات وميكانيمية تحول الخلايا العادية إلـى خلايا أورام فإن المعلومات فى هذين الموضوعين لازالت غير متكاملـة وغيـر

حاسمة. عامة فإن كمية كبيرة من هذه المعلومات قد عرفت خلال العشر سنوات الماضية وهى أن خلايا البكتيريا للسلالات الممرضة للنبات تحمل بلازميد من نوع معين يسمى بلازميد Ti وأن عدم وجود هذا البلازميد يفقد البكتيريا قدرتها علـى إصابة النبات ولابد أن تكون الإصابة بالقرب من جرح حديث. تدخل هذه البكتيريا جزء من البلازميد يسمى T-DNA فى المادة الوراثية لخلايـا النبـات المصـابة بالقرب من الجروح وحيث تصبح خلايا النبات فى هذه المنطقة قابلة لأستقبال هذا الجزء أى T-DNA أى أن خلايا النبات تأخذ أعداد من T-DNA فى هذه المنطقة. ولذلك فإن خلايا النبات فى هذه المنطقة تتحور لكى تصبح قابلـة لأسـتقبال T-DNA وأما عن كيفية هذا التحور وكيفية حدوثه فهو غير معروف. تصبح أجزاء T-DNA ملتحمة بكروموسومات خلايا النبات فى أماكن عديدة. تصبح هذه الخلايا النباتية قادرة على أظهار الصفات الموجودة فى T-DNA وتسمى هـذه الخلايـا بأنها محولة. هذه الخلايا المحولة transformed تنتج opines والتـى تسـتخدم وتستعمل فقط بواسطة خلايا البكتيريا التى تحتوى على بلازميد المحتوى علـى جزء T-DNA. يزداد تركيز مركبات أخرى فى هذه الخلايا النباتية المحولة ومنها الهورمونات النباتية مثل أندول حامض الخليـك وأيضـاً بعـض السـيتوكينينات cytokinins وبعض الإنزيمات.

حتى الآن غير معروف كيف يتم زيادة تركيز الهورمونات والإنزيمات وكيفية تخليق opines وما هى علاقتها بالخلايا المحولة وهل يوجد علاقـة بـين هـذه التغيرات وبعضها أولاً توجد بالمرة وما هو علاقة ذلك بجزء T-DNA ومـا هـو علاقة ذلك كله بأنقسام وكبر الخلايا المحولة فى النبات والتى ينتج عنها نمو غير محكوم uncontrollable لتكوين الأورام.

مقاومة المرض:

تبدأ مقاومة المرض بالمرور والتفتيش على الأشجار والشجيرات فى المشاتل

nursery ورفض المصاب منها وإستبعاده وإبادتــه. فيمنــع زراعــة الأشــجار والشجيرات القابلة للإصابة فى حقول ذات تربــة ملوثــة بالبكتيريــا المســببة للمرض. تزرع الذرة الشامية أو أحد محاصيل الحبوب الأخــرى لعــدة ســنوات متتالية فى الحقول ذات التربة الملوثة بالبكتيريا وقبــل زراعتهــا بالشــتلات أو الشجيرات القابلة للإصابة. حيث أن البكتيريا تخترق النبات عن طريق الجــروح الحديثة فيجب الحذر التام والعناية فى عدم تجريح جذور أو ساق النبــات أثنــاء الزراعة. يجب أيضاً مقاومة الحشرات القارضة للجذور مقاومة تامة فى المشاتل لتقليل حدوث الإصابة كلما أمكن ذلك. يجب إستعمال التطعيم بــالبراعم budding وعدم إستعمال التطعيم بالقلم أى بعده براعم حيث أن درجة إنتشار مرض التدرن التاجى فى الحالة الأولى أقل بكثير من درجة إنتشاره فى حالة التطعيم بــالقلم أى بعده براعم grafting.

يحب شراء وزراعة نباتات خالية من الإصابة. يمكن مقاومة المرض وذلــك بكشط التدرن مع مساحة حوله وأسفله ويتم دهان هذا الجزء بواســطة محلــول elgetol-methanol ويكون ذلك بواسطة الفرشة. يتكون هذا المحلول مــن جــزء واحد sodium dinitrocresol إلى أربعة أجزاء wood alcohol. يمكن دهان المكان بعجينة بوردو.

يمكن مقاومة المرض بدهان مكان الورم بمخلوط من مركبات هيدروكربونيــة عطرية aromatic hydrocarbons يباع تجارياً ويكون هــذا المخلــوط إختيــارى التأثير أى أنه يقتل خلايا وأنسجة التدرن دون أن يقتل الخلايا والأنسجة العاديــة المجاورة ولكن لا يستعمل ذلك عملياً على نطاق واسع.

يمكن عمل مقاومة حيوية لهذا المرض وذلك بنقع البذور أثنــاء الإنبــات أو غمر بادرات المشتل أو الأصول المستعملة كجذور فى معلق من سلالة خاصة من سلالات البكتيريا *Agrobacterium radiobacter* وهــى رقــم ٨٤ (strain No 84) تضاد هذه السلالة من البكتيريا كثير من سلالات البكتيريا المسببة لمرض التدرن

التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابة. يمكن معاملة البذور الغير نابتة بهذه السلالة كما يمكن أيضاً رش وغمر التربة فى مكان النبات بمعلق من خلايا البكتيريا لهذه السلالة. يعتقد أن هذه السلالة ٨٤ من البكتيريا توجد على سطح العائل وتفرز مركز bacteriocin agrocin. يعتبر هذا المركب مثبط لكثير من السلالات الممرضة للبكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابة ومن حدوث التدرن، ولكن لسوء الحظ بعبض سلالات بكتيريا التدرن التاجى الممرضة يمكنها أن تقاوم مركب agrocin 84 ولذلك فإن هذه السلالة البكتيرية فقدت قدرتها على مقاومة المرض فى بعض المناطق.

المتحركات المستعملة فى عزل ونقل الجينات

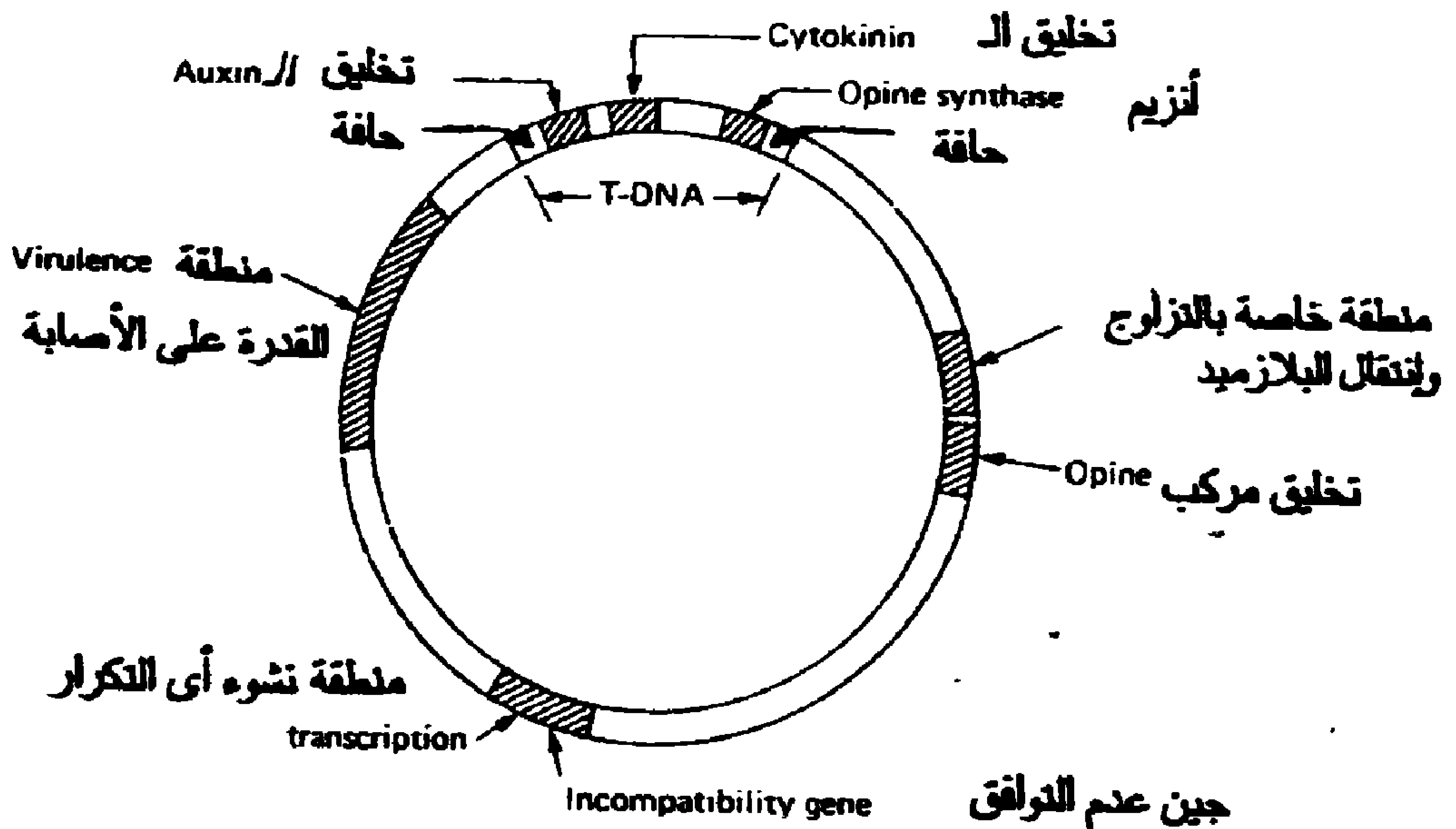
Cloning Vehicles Used For Cloning In Plants:

تعتبر vectors أو cloning vehicles كائنات حية دقيقة عادة أو أجزاء منها agent والتى تنقل المادة الوراثية من كائن حى يسمى الواهب donor إلى كائن حى آخر يسمى المستقبل recipient وبحيث أن هذه المادة الوراثية المنقولة يمكن أن تعبر عن نفسها وذلك بأظهار الصفة أو الصفات الخاصة بها فى الكائن المستقبل أو فى الخلية المستقبلة recipient cell ومثال ذلك البلازميدات والفيروسات البكتيرية أى البكتيريوفاج bacteriophage والتى تسمى أيضاً للأختصار بالفاج phage وذلك فى حالة البكتيريا وأيضاً الفيروس SV40 لخلايا الحيوان. تعتبر الكوزميدز cosmids أيضاً كذلك وهى عبارة عن نوع خاص من البلازميدات المهندسة وراثياً مشتقة من نوع خاص من الفاج وهو الفاج لامدا bacteriophage lambda وهذه البلازميدات والفاج و SV40، و cosmids تستعمل لأنها cloning vehicles أو vectors للمادة الوراثية المنقولة إلى البكتيريا والخميرة والحيوانات. يستعمل البلازميد الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* وأيضاً فيروس موزايك أى تبرقش القنبيط وهو عبارة عن DNA ثنائى الشريط DNA double stranded أى ds DNA فى نقل المادة الوراثية إلى

النبات. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد فيروسات وحيدة الخيط أو الشريط ss-DNA وتسمى geminiviruses وأيضاً فيروسات RNA وحيدة الشريط أو الخيط single stranded RNA(ss-RNA) وهى فيروس موزايك أى تبرقش التبغ tobacco mosaic virus (TMV) وبعض الفيروسات الأخرى وأيضاً المتنقلات transposons تستعمل فى نقل المادة الوراثية فى النبات. وفيما يلى شرح لأهم cloning vehicle فى نقل المادة الوراثية فى النبات وهو البلازميد Ti.

بلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*: يستعمل هذا البلازميد بكثرة فى نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره فى الجزء السابق. يحتوى هذا البلازميد على عديد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها. يحتوى الجزء من هذا البلازميد المسمى T-DNA على عديد من الجينات منها. الجين الأول والذى يخلق إنزيم opine synthetase والذى يقوم بتخليق opines وهى مركبات تنتج فقط بواسطة خلايا النبات العائل المحولة transformed بواسطة هذه البكتيريا. هذه المركبات وهى opines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطة خلايا البكتيريا التى تحتوى على بلازميد Ti. خلايا البكتيريا الخالية من بلازميد Ti غير قادرة على أستعمال opines فى التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتيريا يجب أن تحتوى على جين خاص بتخليق opines. الجين الثانى أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم فى تخليق السيتوكينينات. حيث أن تنشيط تكوين السيتوكينيات فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة من الجينات والتى تتحكم فى تخليق الأوكسينات. حيث أن تنشيط تكوين إندول حامض الخليك فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. الجين الرابع أو مجموعة من الجينات وهى عبارة عن حافتى الجزء T-DNA من الناحية اليمنى والناحية اليسرى وتتكون كل من الحافة اليمنى والحافة اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النووية وهى التى تتحكم فى عملية نقل جزء T-DNA من البلازميد إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل حيث وجد أن إزالة ٢٥ زوج من القواعد النووية أى الحافة

اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وأيضاً تؤثر على قدرة البكتيريا على الإصابة وتصبح غير فعالة فى إصابة النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزيىء T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدرة الطفيل أى البكتيريا على الإصابة virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذا الجزء من البلازميد بمنطقة قدرة البكتيريا على إصابة النبات أى virulence region وهى بعيدة عن منطقة T-DNA تتكون المنطقة الأخيرة من عديد من الجينات. توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيوية أخرى مثل التزاوج الجنسى بين البكتيريا ونقل بلازميد Ti من البكتيريا الممرضة إلى البكتيريا الغير ممرضة وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تخليق مركب opine فى خلايا النبات العائل بعد أن تنتقل هذه الجينات من البلازميد Ti إلى كروموسومات النبات العائل. وأيضاً جين أو جينات تتحكم فى عدم التوافق بين بعض البلازميدات وبعض سلالات من بكتيريا التدرن التاجى وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تحديد مكان أصل وبداية إنقسام ونسخ وتضاعف البلازميد repkication, origin of transcription (شكل ١٢٩).



شكل ١٢٩ : البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التى تقوم بعمل بعض الوظائف الهامة.

يعتبر البلازميد Ti فعال فى نقل DNA الخلية البكتيرية إلى المادة الوراثية فى النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله فى نقل مـــادة وراثيـــة غريبـــة foreign أى غير موجودة به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصـــعب التعامل معه وراثياً genetically manipulate والأهم من ذلك أن الخليـــة للنبـــات العائل تتحول من خلية عادية إلى خلية محولة تنقسم بسرعة كبيرة وتدخل فـــى تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعادة تكون نبات عادى مـــن هـــذه الخلايا المحولة transformed. أتضح أيضاً أن الجينات الموجـــودة فـــى T-DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) لـــيس لهـــا دور فـــى نقـــل جزيىء T-DNA من البكتيريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بكروموسوماته. ومما هو جدير بالذكر أن إدخال جينات أو أجزاء DNA من خلايـــا الحيـــوان أو البكتيريا أو النباتات الزهرية التى ليس لها علاقة بالنبات العائـــل إلـــى T-DNA البلازميد حيث توجد هذه الجينات فى داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى المادة الوراثية فى النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خاملـــة أى غير قادرة على التعبير عن وجودها فى النبات العائل وإظهار صفاتها. ولكن فـــى بعض الحالات وعند إضافة جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيـــئ promoter region لجين إنزيم opine synthetase فإن هذا الجـــين يســـمى جـــين كيميرى chimaeric gene وبذلك يمكن لبعض الجينات المنقولة أن تصبح نشـــطة أى قادرة على إظهار صفاتها فى خلايا النبات وذلك نتيجة لنشاط بعض الإنزيمات الخاصة بها.

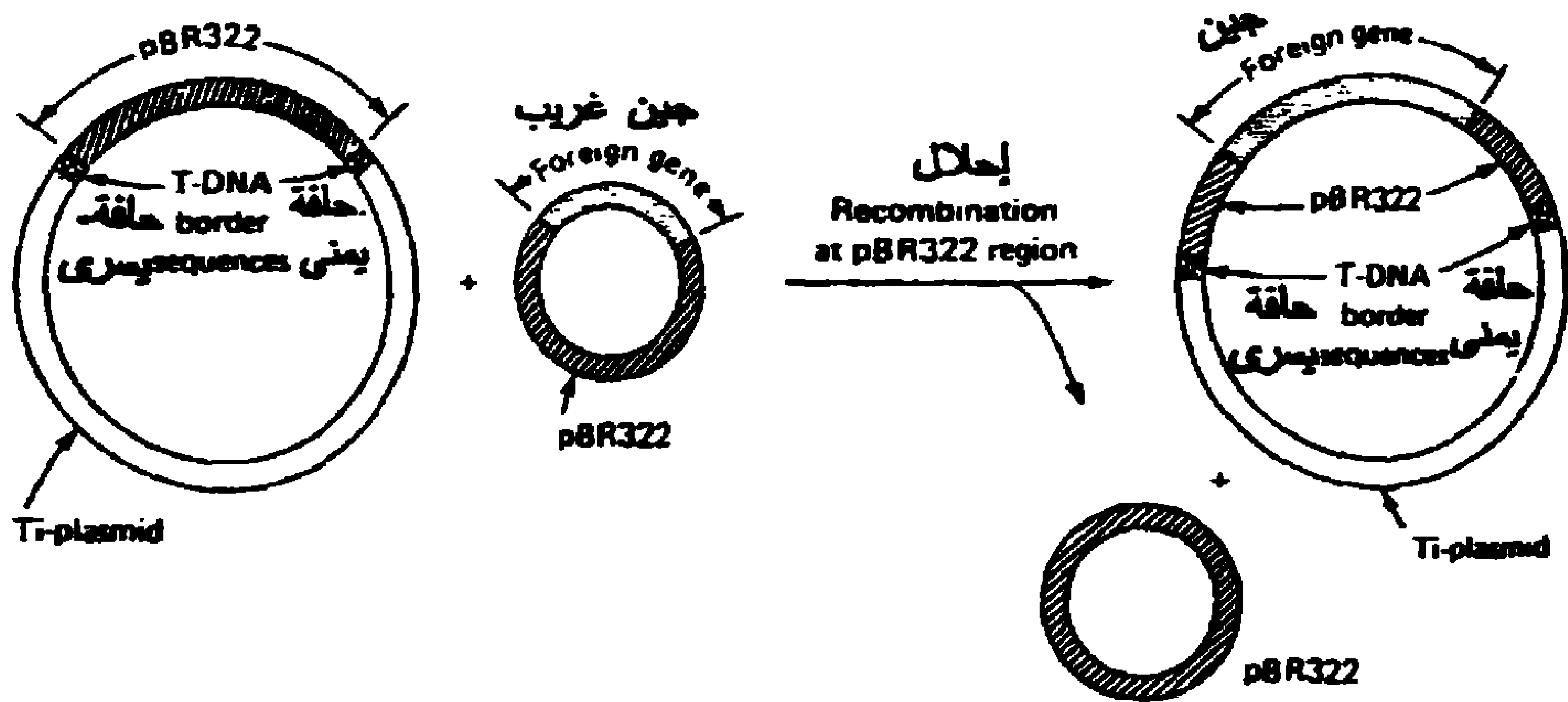
يمكن إزالة الجزء الخاص بتكوين التدرن أو الورم من البلازميد وهو عبـــارة عن الجزء المحتوى على الجينات الخاصة بتخليق الأوكسينات والســـيتوكينينات فقط من T-DNA دون إزالة الحافتين اليمنى واليسرى واللذين تتحكمان فى نقـــل T-DNA إلى خلايا العائل يسمى الجزء الخاص من البلازميد Ti الذى يتحكم فـــى تكوين الورم tumor inducing باسم منطقة أو نكوجينك oncogenic region. وهى

الجزء الذى يحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينيات. يتم نقل هـذا البلازميد إلى خلايا النبات العائل وتصبح خلايا النبات العائل المحتوية على هـذا البلازميد فاقدة للقدرة على الهياج وأيضاً فاقدة القدرة على عدم التأثر بأوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العائل أو بمعنى آخر فإن الخلايـا المحولـة تصـبح محكومة وتحت تأثير أوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العادية ولـذلك فـإن هذه الخلايا المحولة تكون فاقدة الإنقسام السريع وتكوين الورم أو التدرن بالرغم من إحتوائها على البلازميد. كما يمكن لهذه الخلايا المحولة والتى تحتوى علـى عوامل وراثية جديدة أن تنقسم إنقساماً عادياً وبسرعة عادية لتكوين نبات محول كامل جديد به عوامل وراثية جديدة.

أى أنه بذلك تصبح الخلايا المحولة خلايا عادية بها مادة وراثيـة أو عوامـل وراثية جديدة وبالطبع تفقد هذه الخلايا المحولة قدرتها على الهياج. يمكن شـغل الأماكن الخالية فى بلازميد Ti فى هذه الحالة وهى أماكن جينـات الأوكسـينات والسيتوكينينات فى جزيىء T-DNA بواسطة جينات كيميرية خاصـة بمقاومـة بعـض المضـادات الحيويـة شـديدة السـمية مثـل كاناميسـين kanamycin وميثوتريكسيت methotrexate. يمكن وضع هذين المضادين الحيويين فى البيئـة وبذلك تصبح بيئة إنتخابية حيث ينمو علهيا فقط الخلايا المحولة والتى تحتـوى على جينات المقاومة لهذين المضادين الحيويين وأيضـاً تنمـو عليهـا النبـات المحولة فقط والتى لها صفة المقاومة لهذين المضادين الحيويين. وبذلك يسـهل عزل الخلايا المحولة من الخلايا الأخرى حيث أن الخلايا المحولة تعيش والخلايا العادية تموت.

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبة وذلك بإزالة الجزء الأساسى فـى T-DNA مع ترك الحافتين (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) أى إزالة الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم شغل هذا المكـان الفـارغ مـن

البلازميد بواسطة بلازميد آخر صغير ومدروس وراثياً تماماً أى معروف فيه تتابع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتيريا *E. coli* ومثال البلازميد pBR322. يتم أيضاً وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخر من نفس النوع أى pBR322 أى عمل cloning للجين فى البلازميد. يسمح للبكتيريا *A. tumefaciens* بأخذ هذين النوعين من البلازميد وهو النوع الحامل للجين المطلوب إدخاله فى المادة الوراثية والنوع الآخر هو الغير حامل للجين أى بلازميد Ti. يحدث homologous recombination بين البلازميدات pBR322 فى بعض خلايا البكتيريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له cointegration فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزيئين من بلازميد *E. coli* وهو PBR322 وذلك لبلازميد الخلية البكتيرية المسببة لمرض التدرج التاجى أى بلازميد Ti (شكل ١٣٠).



شكل ١٣٠: نقل جين غريب إلى البلازميد Ti بإستعمال بلازميد آخر صغير.

عند إضافة الخلية البكتيرية للنبات فإنها تنقل إلى كروموسومات خلية النبات جميع أجزاء DNA الموجود بين حافتين جزء T-DNA أى أنها تنقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل بلازميد *E. coli* أى pBR322 بما يحمله من الجين

المطلوب نقله. ولقد أستعملت هذه البلازميدات بنجاح وبكفاءة عالية فى نقل الجينات المطلوبة إلى كروموسومات خلية أو خلايا النبات العائل ثم ينتج من هذه الخلايا نبات كامل خصب عادى يحتوى على الجينات المنقولة وتصبح هذه الجينات كجزء عادى من كروموسوم النبات. وتنتقل أيضاً إلى نسل هذا النبات عن طريق حبوب اللقاح وخلية البيضة وبالطبع يسبق تكوين هذه الأجزاء الأنقسام الأختزالى والذى ينقسم فيه الجين المنقول بطريقة عادية كما فى جينات النبات الأخرى.

توجد طريقة أخرى تستعمل للتغلب على كبر حجم البلازميد Ti وهى نقل أى جين مطلوب أو جينات مطلوبة بين حافتى جزء T-DNA ثم نقل هذا الجزء وهو الحافتين والجين أو الجينات المطلوب نقلها إلى بلازميد صغير وبذلك يصبح هذا البلازميد الصغير محتوى على الحافتين لجزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوب نقلها. يتم نقل المنطقة أو الجزء من البلازميد الخاص بقدرة الطفيل على إصابة النبات virulence region من هذا البلازميد إلى بلازميدات أخرى صغيرة. كلا من هذين النوعين من البلازميدات الصغيرة غير قادر على إصابة النبات على إنفراد. وعند السماح بخلط هذين النوعين من البلازميدات بالبكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجى فإنها تنتقل إلى داخلها وتصبح خلايا هذه البكتيريا قادرة على إصابة النبات لأحتوائها على جين أو جينات الإصابة كما أن حافتى جزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوبة تنتقل إلى كروموسومات خلية النبات العائل وتصبح جزء منها. وبذلك يتم نقل الجين أو الجينات إلى النبات العائل بكفاءة عالية.

تزداد الآن المعلومات الخاصة بأستعمال بلازميد Ti فى نقل الجينات أى أستعماله cloning vehicle أو vector وكلها فى صالح هذا البلازميد حيث أن يحدث تقدم ملحوظ فى إستعماله مع وجود طرق جديدة بإستمرار لتسهيل أستعماله وزيادة كفاءة أستعماله فى حالات متعددة لم يكن يستعمل فيها أصلاً.

ولذلك فإن نقل جينات من البكتيريا أو النبات أو الحيوان إلى خلايا النبات أصبح في الأمكان وأمكن أنجازه. ولكن مدى وكيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها في خلايا النبات العائل الجديد regulatory controls of expression of genes غير معروفة أو معروف عنها القليل. تصيب بكتيريا التدرن التاجي النباتات ذات الفلقتين فقط ولا تصيب النباتات ذوات الفلقة الواحدة وبالرغم من أن كثير من محاصيل الغذاء مثل القمح والذرة والأرز وقصب السكر تتبع نباتات ذوات الفلقة الواحدة. وأيضاً نفس الشئ بالنسبة للبلازميدات Ti. ولكن أمكن الآن تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات فلقتين مباشرة ببلازميد Ti أو ببروتوبلاست خلايا بكتيرية ويسمى هذا البروتوبلاست الأخير sphaeroplasts ويمكن إنتاج نباتات كاملة بعد ذلك من هذه البروتوبلاست. وأمكن الآن أيضاً تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات الفلقة بواسطة بلازميد Ti ولكن حتى الآن يصعب أو يستحيل إنتاج نباتات ذوات فلقة كاملة من البروتوبلاست وذلك على عكس من ذوات الفلقتين.

زيادة الدراسات والمعلومات عن بلازميد Ti لا تزيد فقط من معلوماتنا عن طبيعة الطفيل المرضية أى طبيعية بكتيريا التدرن التاجى بل أيضاً تزيد من كفاءة نقل جينات مقاومة لأمراض النبات من نبات إلى آخر ويمكن أن يكون هذا النبات الأخير من جنس مختلف أو حتى من عائلة مختلفة. ومن مميزات هذه الطريقة أنها تنقل الجين المطلوب إلى خلية النبات العائل دون زيادة في جينات غير مرغوبة ودون حدوث نقص في جينات مرغوبة ومن مميزاتها أيضاً أنها سريعة ولا تحتاج إلى وقت لعمل التهجين بين النباتات crosses وأيضاً لعمل التهجينات الرجعية backcrosses. تعتبر العقبة الرئيسية في أستعمال بلازميد Ti في مقاومة أمراض النبات هى نقص المعلومات عن مكان وجود جينات المقاومة في النبات في جينومات النباتات المختلفة وأيضاً كيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها في النباتات الجديدة المنقولة إليها.

٥ – بلازميد pIAA للبكتيريا *Pseudomonas*:

الأوكسينات والبكتيريا *Pseudomonas savastanoi* ومرض تعقد الزيتون.

تصيب هذه البكتيريا نبات الزيتون والدفلة *Nerium oleander* وتسبب حدوث أورام على الجذور والسيقان والفروع والأوراق وأعناق الثمار مسببة مرض تعقد الزيتون Olive knot تبدأ الأورام صغيرة ثم تكبر تدريجياً وقد تصل الأورام أحجام كبيرة قطرها عشرة سم أو يزيد. كما أن الأفرع الطرفية فى النبات تتقزم أو تموت. وقد تسبب الإصابة الشديدة موت الأشجار. تعيش هذه البكتيريا فى داخل هذه الأورام. وبدراسات البيولوجيا الجزيئية molecular biology والهندسة الوراثية لهذه البكتيريا أتضح أن البكتيريا المسببة لتعقد الدفلة تختلف عن البكتيريا المسببة لتعقد الزيتون فى موقع الجينات اللازمة لتخليق إندول حامض الخليك حيث وجد فى الحالة الأولى جينات مسئولة عن تخليق IAA على البلازميد وهى الجينات iaaM وهى مسئولة عن تخليق إنزيم تربتوفان mono oxygenase والذى يقوم بتحويل الحامض الأمينى تربتوفان داخل البكتيريا إلى indoleacetamide وأيضاً الجينات iaaH المسئولة عن تخليق إنزيم indoleacetamide hydrolase وهذا الإنزيم الأخير يقوم بتحويل indoleacetamide إلى إندول حامض الخليك كما يوجد أيضاً iaaL وهى جينات مسئولة عن تخليق إنزيم IAA lysine synthetase وهو يسبب أرتباط IAA مع الحامض الأمينى ليسين ليتكون IAA المرتبط أى IAA lysine. تحدث جميع الخطوات السابقة داخل خلية البكتيريا. ينتشر IAA lysine من داخل خلية البكتيريا إلى خلية النبات وحيث تفرز خلية النبات إنزيم IAA lysine hydrolase وحيث يسبب ذلك فصل الأخير إلى IAA والحامض الأمينى ليسين، يصبح إندول حامض الخليك حر وفعال حيث أنه فى الصورة المرتبطة يكون غير فعال. يسبب إندول حامض الخليك تنشيط وتشجيع خلية وخلايا النبات على الأنقسام السريع ولذلك يتكون الورم. وجد نفس الشئ فى بكتيريا تعقد الزيتون إلا أن هذه الجينات لا توجد على البلازميد كما فى

الدفلة (شكل ١٣١) بل توجد على الكروموسوم البكتيـرى أى الخـاص بالخليـة البكتيرية. أى أن فى البكتيريا التى تصيب الدفلة توجد هذه الجينات على البلازميد أما البكتيريا التى تصيب الزيتون توجد هذه الجينات على الكروموسوم البكتيرى. يسمى هذا البلازميد الموجود فى داخل خلية البكتيريا بأسم بلازميد إندول حامض الخليك pIAA (شكل ١٣١).

أمكن تثبيط جينات iaa L على البلازميد فى خلايا بكتيريا الدفلة ولـم تـتمكن خلايا البكتيريا فى هذه الحالة من تكوين الأورام على نبات الدفلة، أى أن تكـوين الأورام على النبات مرتبط بنشاط وفاعلية وكفاءة جينات iaa L الموجودة علـى بلازميد الخلية البكتيرية.

أمكن إدخال جينات iaa H و iaa M من هذه البكتيريا إلـى نـوع آخـر مـن البكتيريا لايحدث أورام علـى النبـات وهـى *Erwinia herbicola pv gypsophila* وأصبحت البكتيريا الأخيرة قادرة علـى عمـل أورام علـى النبـات oncogenic activity.

تعتبر جينات iaa M و iaa H عبارة عن IAA operon توجد هـذه الجينـات نفسـها علـى البلازميـد Ti أى Ti plasmid فـى البكتيريـا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى. يثبت ذلك أن هذين النـوعين مـن البكتيريا *P. savastanoi* و *A. tumefaciens* لهما أصل مشترك واحد أى أنهما نسل وأحفاد لأصل واحد وجد منذ أزمنة أو عصور أو أحقاب جيولوجية أو منذ زمـن بعيد.

حالة الجينات المسئولة عن تكوين السيتوكينينيات فى بكتيريـا *P. savastanoi* غير واصحة وغير معروفة بالتفصيل كما فى حالة بكتيريا التدرن التاجى وكمـا سبق شرحه.

بالرغم من أن هذين المرضين مرض التدرن التاجى ومرض تعقـد الزيتـون

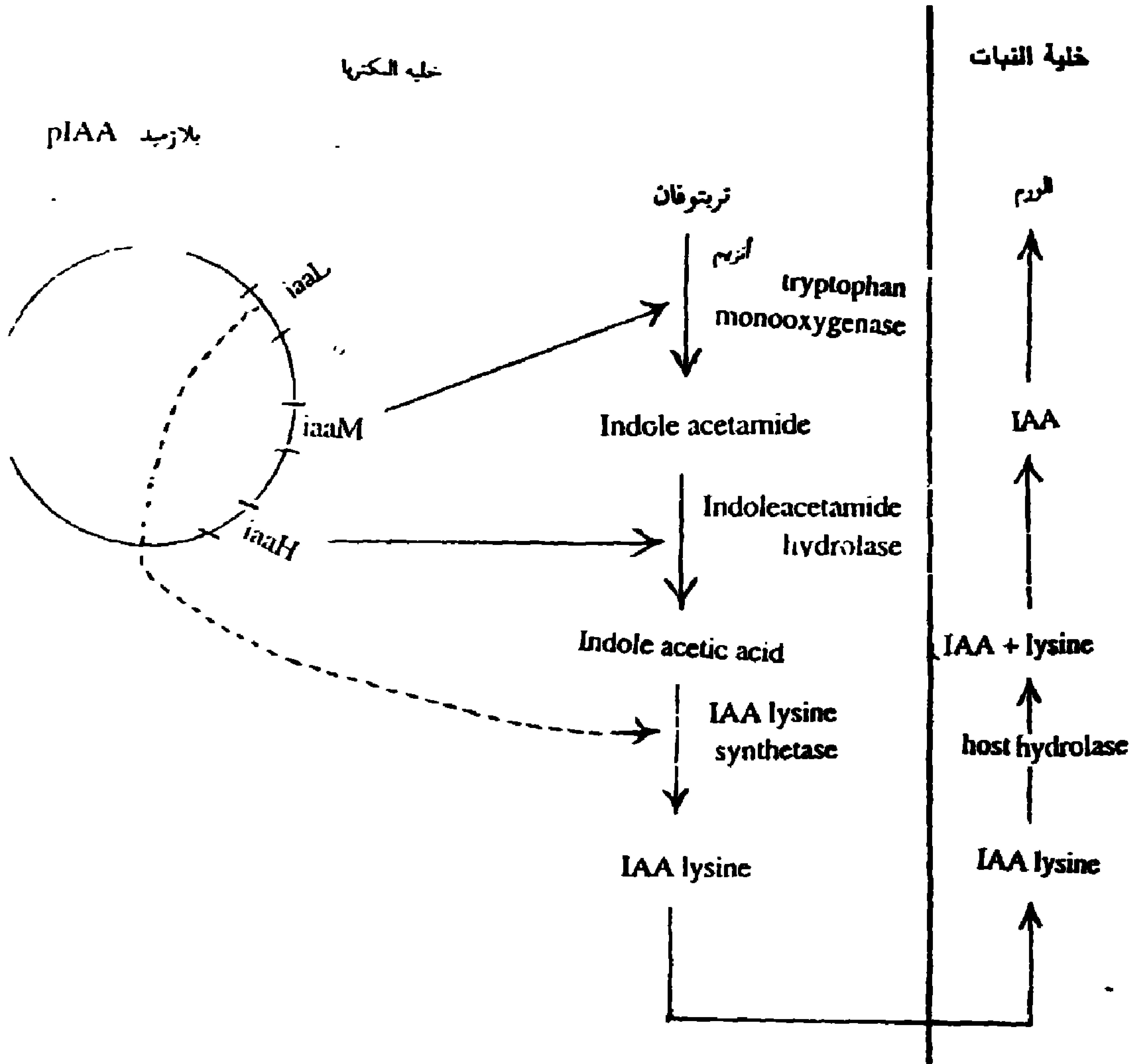
ينشئا، عن جنسين مختلفين من البكتيريا وهما *Agrobacterium* و *Pseudomonas* إلا أن الهندسة الوراثية قد أثبتت عن طريق فسيولوجيا النبات أن هذين الجنسين قد كانا منذ أجيال جيولوجية سحيقة جنس واحد وأنهما من أصل واحد أى جد سحيق واحد لهذين الجنسين ثم تميزا بعد ذلك بمرور العصور والأزمنة والأحقاب الجيولوجية إلى جنسين مختلفين حاليين.

٦ – البلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع Broad host range plasmids :

أغلب البلازميدات يمكن أن تبقى وتتواجد فى عدد محدود من البكتيريا المتقاربة فى تركيبها الوراثى، وهذه تسمى بلازميدات ذات مدى عوائلى ضيق narrow host range plasmids. البلازميدات R القابلة للإنتقال ذاتياً فى مجموعة عدم التوافق IncP للبكتيريا إ. كولاى وأيضاً المجموعة IncP1 للبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، على أى حال، واضح أنها يمكن إنتقالها وبقائها فى عدد كبير من أنواع البكتيريا. وهذه تسمى بلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع broad host range plasmids. غير معروف السبب فى أن بعض البلازميدات لها مدى عوائلى ضيق وأخرى لها مدى واسع. يمكن أستعمال البلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع فى الدراسات الوراثية فى مدى واسع من أصناف وأنواع البكتيريا. ولأنها يمكنها الإلتحام (بتكرارية منخفضة) فى كروموسوم العائل لكثير من الأنواع، فإنها تقدم أداة هامة لعمل الخرائط الوراثية لكائنات أو أنواع أو أصناف أو أجناس لم يكن عمل خرائط وراثية لها سابقاً. بهذه الطريقة، الخرائط الوراثية تم الحصول عليها لكثير من البكتيريا الهامة الإقتصادية، وهذه الخرائط أو الأمكانيات لعمل هذه الخرائط سهلت بناء وتخليق وتركيب السلالات ذات الصفات المرغوبة.

كثير من هذه البلازميدات قادرة على تحريك الكروموسوم ولكن بنسبة أى تكرارية منخفضة جداً (حوالى $١٠^{-٨}$ لكل خلية). بواسطة طرق وراثية مختلفة

وطرق إعادة صياغةدنا مختلفة، على أى حال، فإن أنــواع مختلفــة مــن هــذه البلازميدات تم بناؤها أى تركيبها معملياً لتساعد حركة الكرموسوم، وفيها حركة الكروموسوم تم تنشيطها بدرجة معينة أى بعامل factor (by factor) وهو 10^{2} إلى 10^{5}.



شكل ١٣١ : خطوات تخليق إندول حامض الخليك فى داخل البكتيريا Pseudomonas savastanoi ودوره فى تكوين الورم فى النبات العائل.

٦ – البلازميدات الممرضة للإنسان والحيوان

Animal and human infectious plasmids:

عديد من البلازميدات تجعل البكتيريا الغير ممرضة للإنسان أو الحيوان ممرضة؟ نفس الشئ بالنسبة للبكتيريا الخالية من البلازميدات. تخلق البلازميدات المسماة البلازميدات Ent الخاصة بالبكتيريا إ. كولاى سموم داخلية enterotoxins وهى المسئولة عن إسهال معين يسمى الإسهال المتحرك أو إسهال المسافرين traveler's diarrhea. البلازميد المعروف بإسم Hly (for hemolysis) يوجد فى سلالات البكتيريا إ. كولاى. الموجودة فى الخنازير وهو بلازميد مسئول عن تحليل الدم. بالرغم من أن الهيموليسين hemolysin يفسد ويحطم كرات الدم الحمراء فى عينات الدم فإن البلازميد Hly يسبب أى إصابة أو مرض. بعض البلازميدات الموجودة فى البكتيريا الممرضة للإنسان المسماة *S. aureus* تسبب زيادة وتشجيع الإصابة بالبكتيريا. إنزيم البنيسللينيز penicillinase والذى يسبب تحطين وتحليل حزيىء البنسلين وفساده والناتج عن جين أو جينات موجودة على بلازميد موجود داخل الخلية البكتيرية *S. aureus* قد تم دراسته بالتفصيل.

٨ – بلازميدات أخرى Other plasmids:

عديد من أنواع البكتيريا *Pseudomonas* يمكن أن تستعمل مئات عديدة من المركبات العضوية كمصدر للكربون وخاصة المركبات العضوية السامة مثل الكامفور camphor والتلوين والأوكتين octane. هذه القدرة على التحول الغذائى موجودة فى مجموعة من البلازميدات وهذه المجموعة معروفة بإسم البلازميدات المحللة degradation plasmids. كل بلازميد قادر على عمل طريقة أو أكثر للتحول الغذائى لهذه المركبات وذلك لتحليل هذه المركبات. ولأن هذه العمليات تحتاج إلى إنزيمات كثيرة فإن البلازميدات تكون كبيرة بدرجة كافية. هذه البلازميدات تمكن البكتيريا من تحطيم كثير من المركبات التركيبية وهكذا تصبح

أداة هامة فى إزالة ملوثات البيئة الناتجة عن أنشطة الإنسان. مثال ذلك، بعض السلالات يمكنها تحطيم المركبات الإيدروكربونية الكلورية الثابتة جداً ومبيدات الحشائش وعديد من المنظفات detergents. كثير من المعامل تحاول إستعمال الهندسة الوراثية لتركيب بلازميدات راقية أو مميزة أو متطورة أو رفيعة المستوى والتركيب super plasmids والتى تستعمل فى منع ومقاومة التلوث والتخليق الكيماوى.

بعض البلازميدات المعزولة والتى تسبب مقاومة العائل ضد الأيونات المعدنية السامة. بعض هذه البلازميدات موجودة فى البيئات المختلفة المحتوية على هذه الأيونات ومثال ذلك النفايات sludge المنتجة بواسطة إعادة التكوين والتحميض الصناعى للأفلام أى أفلام التصوير (المقاومة لأيون الفضة). تمت دراسة مستفيضة للكيمياء الحيوية الخاصة بمقاومة أيونات الزئبق Hg^{++}. وهى ناتجة من بلازميدات مشفرة لإنزيم الإختزال reductase والذى يحول الزئبق Hg^{++} إلى زئبق معدنى والذى يكون متطاير بدرجة كافية وبذلك يتطاير بسهولة بعيداً عن المكان.

ملخص عام عن البلازميدات
Summary on Plasmids

بعض الخواص والملامح الرئيسية للبلازميدات
Basic features of plasmids

البلازميدات تتكون من دنا حلقى وتوجد مستقلة بداخل الخلية البكتيرية تحمل البلازميدات جين أو أكثر. تكون هذه الجينات مسئولة عن بعض الصفات لخلية البكتيريا الحاوية لها ومنها أنها تعيش فى تركيز مرتفع من المضادات الحيوية مثل الأمبسيللين والكلورامفينكول. فى تجارب مقاومة المضادات الحيوية فإنها

تستخدم كمعلم إنتخابى selectable marker وبها يمكن أثبات أن خلية البكتيريا تحتوى على بلازميد معين يحتوى البلازميد على الأقل تتابع واحد لدنا معين وهذا التتابع هو منطقة أصل تكرار أى تضاعف أى تكاثر البلازميد origin of replication ولذلك فإن هذه البلازميدات يمكن أن تتكاثر فى داخل الخلية البكتيرية مستقلة عن الكرموسوم البكتيرى. فى حالة البلازميدات الصغيرة تستخدم الإنزيمات اللازمة لتكرارها أى تضاعفها أى تكاثرها أى تكرار دنا replicative enzymes الخاصة بخلية البكتيريا أى تستخدم إنزيمات الخلية البكتيرية. ولكن فى حالة البلازميدات الكبيرة فإنها تحمل جينات خاصة بتخليق إنزيمات خاصة متخصصة فى تكرار أى تضاعف البلازميد. قليل من البلازميدات تكون قادرة على الإلتحام بالكروموسوم البكتيرى. هذه البلازميدات تعتبر مكملة للكروموسوم البكتيرى integrative plasmids يمكن أن تسمى episomes. يمكن أن يستمر الحال فى هذه الحالة لعدة أنسال وأجيال من البكتيريا ولكن بعد ذلك يمكن أن تصبح مستقلة على الكروموسوم مرة أخرى non-integrative plasmids ظاهرة التكامل مع الكرموسوم البكتيرى integration تحدث أيضاً فى حالة بعض الفاجات وسيتم شرحها فى باب تالى.

حجم وعدد البلازميدات Size and copy number:

هاتين صفتين هامتين للبلازميدات التى تستخدم فى تجارب التوطين. تستخدم فى هذه العملية بلازميدات أقل من ١٠ كيلو قاعدة kb وتستخدم كناقل وسيط متحرك cloning vehicle. يتراوح حجم البلازميدات من ١ كيلو قاعدة للبلازميدات الصغيرة إلى أكثر من ٢٥٠ كيلو قاعدة للبلازميدات الكبيرة (جدول ٢١). ولهذا فإن قليل من البلازميدات يستخدم فى تجارب التوطين. ولكن فى بعض الحالات البلازميدات الكبيرة يمكن أقلمتها للتوطين فى وجود ظروف خاصة.

أما عن عدد البلازميدات داخل خلية البكتيريا الواحدة copy number فإنها

تختلف أما عن العوامل التى تتحكم فى العدد غير معروفة بالتفصيل أو جيدا. يوجد فى الخلية البكتيرية بلازميد واحد خاصة فى حالة البلازميدات الكبيرة وأكثر من ذلك خاصة فى حالة البلازميدات الصغيرة حيث قد يصل عددها ٥٠ أو أكثر. عامة يفضل فى تجارب التوطين أن يوجد بداخل الخلية البكتيرية عدد كبير من البلازميدات المعاد صياغتها وهكذا يمكن الحصول على كميات كبيرة من البلازميدات المعاد صياغتها.

جدول ٢١: أحجام بعض البلازميدات.

البلازميد	الحجم		الكائن (نوع البكتريا
	الوزن الجزيىء MDa	طول النيوكليوتيد (كيلو قاعدة)	
pUC8	١,٨	٢,١	*E. coli*
ColE1	٤,٢	٦,٤	*E. coli*
RP4	٣٦	٥٤	*Pseudomonas* and others
F	٦٣	٩٥	*E. coli*
ToL	٧٨	١١٧	*Pseudomonas putida*
pTi Ach5	١٤٢	٢١٣	*Agrobacterium tumefaciens*

التزاوج والتوافق Conjugation and compatibility:

يوجد نوعين من البلازميدات متزاوجة conjugative وغير متزاوجة non-conjugative. البلازميدات المتزاوجة تتميز بقدرتها على تنشيط وحدوث التزاوج الجنسى بين خلايا البكتيريا وبالتالى وجود البلازميد فى الخليتين المتزاوجتين نتيجة لتكاثره. وهكذا يمكن أن ينتشر البلازميد فى خلايا المستعمرة البكتيرية. التزاوج وإنتقال البلازميد من خلية أخرى يتحكم فيه مجموعة من الجينات تسمى مجموعة الإنتقال set of transfer أو تسمى *tragenes* والتى توجد على البلازميد المتزاوجة وتكون غائبة فى حالة البلازميدات الغير متزواجة. ومما هو جدير

بالذكر أن بعض البلازميد غير المتزاوجة فى بعض الظروف الخاصة تنتقل مع البلازميدات المتزاوجة cotransferred along with a conjugative plasmid عندما يوجدان فى نفس خلية البكتيريا. كثير من أنواع البلازميدات توجد فى داخل الخلية الواحدة، شاملة أكثر من نوع من البلازميدات المتزاوجة. فى حالة البكتيريا إ. كولاى فإن من المعروف أن الخلية الواحدة تحتوى على عدد من البلازميدات المختلفة قد يصل إلى سبعة. ولكى يستمر وجود هذه البلازميدات المختلفة فى الخلية البكتيرية يجب أن تكون متوافقة compatible فى حالة وجود بلازميدين غير متوافقتين فى نفس الخلية فإن إحدهما يفقد من الخلية بسرعة. توجد أنواع عديدة من البلازميدات يمكن أن تصنف تبعاً لذلك فى مجاميع عدم توافق مختلفة incompatibility groups. والبلازميدات فى مجموعة عدم التوافق الواحدة تكون متقاربة ومتشابهة فى كثير من الصفات are often related to each other in various ways أساسيات عدم التوافق غير معروفة بالتفصيل أو بدقة.

تصنيف البلازميدات Plasmid classification:

تصنيف البلازيمدات التى تتواجد طبيعياً natural plasmids يكون على أساس الصفات الرئيسية المشفرة والمحكومة بجينات البلازميد. وفيما يلى الخمسة أنواع الرئيسية تبعاً لهذا التقسيم:

١ - بلازميدات الخصوبة أو بلازميدات Fertility or F plasmids: F:

لابد أن تحمل هذه البلازميدات مجموعة الجينات المسماه tra أى tra genes. أى يكون لها القدرة على تنشيط التزاوج بين خلايا البكتيريا وإنتقال البلازميدات ومثال ذلك البلازميد F فى البكتيريا إ. كولاى.

٢ - بلازميدات المقاومة أو بلازميدات Resistance or R plasmids R:

تحمل جينات تضفى وتكسب خلية البكتيريا مقاومة لمضاد حيوى واحد أو أكثر أو عامل أو أكثر مضاد للبكتريا antibacterial agent مثل الكلورامفينكول

والأمبسيللين والزئبق هذه البلازميدات هامة جداً فى حالة علم الأحياء الدقيقة الإكلينيكى clinical microbiology لأنها تكسب البكتيريا الممرضة مقاومة للمضادات الحيوية وبذلك تشتد وطأة المرض أو الأمراض لفشل المضادات الحيوية فى مقاومة البكتيريا مثل البلازميد RP4 والموجود عادة فى Pseudomonas وبعض البكتيريا الأخرى.

٣ - بلازميدات Col plasmids colicins Col:

ينتج عنها بروتين أو بروتينات تسمى Col plasmids colicins وهى عبارة عن بروتينات يمكن أن تقتل بكتيريات أخرى ومثال ذلك البلازميد ColE1 للكتيريا إ. كولاى.

٤ - البلازميدات المحللة Degradative plasmids:

تمكن الخلايا البكتيرية من تحليل مركبات غير معتادة مثل التلوين وحامض السلسيك، ومثال ذلك البلازميد ToL الموجود فى البكتيريا *Pseudomonas putide*.

٥ - البلازميدات الممرضة Virulence plasmids:

وهى تكسب الخلية البكتيرية القدرة على الإصابة مثل البلازميد Ti للبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* والتى تسبب إصابة للنباتات مكونة مرض التدرن التاجى والذى يصيب النبات ذوات الفلقتين.

وجود البلازميدات فى كائنات أخرى خلاف البكتريا

Presence of plasmids in organisms other than bacteria:

تكون البلازميدات منتشرة فى البكتيريا ولكنها غير موجودة فى الكائنات الأخرى إلا قليل منها. ففى بعض الكائنات حقيقية النواة مثل الفطريات الخيطية وأيضاً فى فطر غير خيطى وهو الخميرة. ومن هذا القليل فطر خميرة الخباز bake's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) حيث يحتوى على بلازميد حلقى طوله ٢ ميكرومتر، يوجد هذا البلازميد فى كثير من سلالات هذا الفطر. إكتشاف

هذا البلازميد فى هذا الفطر من الأهمية بمكان لأنه أعطى الفرصة لتكوين ناقلات وسيطية متحركة vectors قادرة على توطين الجين بداخل هذا الفطر الهام جداً فى الصناعة مثل الخبز والجعه. وفى حالة الفطريات الخيطية توجد قليل من الفطريات بها بلازميدات ومنها الفطر *Rhizoctonia solani* وهو فطر رمى كما أنه يسبب أمراض للنبات. أما عن الكائنات الحية الأخرى فلم يذكر وجود البلازميدات فيها حتى الآن.

البلازميدات غير الحلقية Non circular plasmids:

فى الكائنات بدائية النواة تكون البلازميدات حلقية ولكن توجد حالات قليلة يكون فيها البلازميد. شريطى غير حلقى مثل Streptomycetes وأيضاً *Streptococci* وبعض سلالات من *Nocardia opaca*. وغير معروف كيف أن دنا فى هذه الحالة يقى نفسه من فعل وتأثير إنزيمات exonucleases فى حالات الفطريات الخيطية مثل الفطر *Rhizoctonia solani* يكون البلازميد شريطى أيضاً. فى الفطر الأخير وجد أن السلالات التى تحتوى بلازميدات تكون ضعيفة النمو وضعيفة فى قدرتها على إصابة النباتات مع حدوث تحلل وموت لخلايا الفطر ومع عدم تكوين أجسام حجرية ومع وجود تركيزات عالية من حامض الأوكساليك ونشاط منخفض لبعض الإنزيمات منها adenylate cyclose وأيضاً phosphodiesterase وأيضاً تركيز منخفض من cAMP. والعكس صحيح فى السلالات الخالية من البلازميدات. توجد أيضاً بلازميدات شريطية فى الفطر *Ceratocystis ulmi* وأحجامها تتراوح بين ٢٢ كيلو قاعدة وأقل من ذلك وقد تصل ٨ أو أقل والسلالات الممرضة للنبات تحتوى بلازميدات. والسلالات الغير ممرضة للنبات لا تحتوى بلازميدات أى أن الحالة عكس الفطر السابق. كما أن السلالات التى تحتوى بلازميدات تفرز كميات كبيرة من مركب ceratoulmin والعكس صحيح فى السلالات الغير ممرضة. وجد أن الفطر *Gaeumanomyces graminis* تحتوى هيفاته على بلازميدات شريطية وهو يسبب مرض take-all فى القمح.

المراجـع

المراجــــع

أولاً – المراجع العربية:

١ – عماد، فسيولوجيا النبــات، ١٩٩٨، المكتبــــة الأكـــاديمية، القاهـــرة. (منفردا).

٢ – منظمات النمو والإزهــار، ١٩٩٥، المكتبــــة الأكـــاديمية، القاهـــرة. (منفردا).

٣ – أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيويـــة، ١٩٩٣، المكتبـــة الأكاديميـــة، القاهرة. (منفرداً).

٤ – أبصال الزينة وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعـــارف بالأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب (طبعة ثانية ٢٠٠٢).

٥ – زهور القطف وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة، ١٩٨٩، منشأة المعـــارف الأسكندرية بالإشتراك مع الدكتور / محمود خطاب.

٦ – مورفولوجيا وتشريح النبات، طبعات كثيرة مـــن ١٩٦٩ حتـــى ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالأشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.

٧ – المملكة النباتية، طبعات كثيرة من ١٩٧٠ حتى الآن، دار المعارف الحديثة، بالأشتراك مع الدكتور / حسين العروسى.

٨ – الأطلس النباتى، ١٩٩٠، دار المعارف الحديثة بالأشـــتراك مـــع الـــدكتور / حسين العروسى والدكتور / سمير ميخائيل.

٩ – فسيولوجيا النبات التجـــارب العمليـــة، ١٩٧٩، دار المطبوعـــات الجديـــدة بالأشتراك مع الدكتور / جمال حسونة والدكتور / مجدى مدكور.

١٠ – طرق ومناهج البحث العلمـــى، ٢٠٠٣، منشـــأة المعـــارف بالأســـكندرية. (منفرداً).

ثانياً – المراجع الأجنبية:

Agriso, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, U.S.A. Alcamo, E. D. 2001. Encounters In Microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Boston, U.S.A.

Alcamo, E. D. 2001. Laboratory Fundamentals of Microbiology. Jones and Bartleet Publishers, U.S.A.

Anonymous. 2001. The Ribosome. Cold Spring Harbor Laboratory Press-A Symposium.

Banwart, G. J. 1989. Basic Food Microbiology. Chapman and Hall, Inc., New York, U.S.A.

Berne, R. M.; Levy, M. W. 1990. Principles of Physiology. The C. V. Mosby Company. St. Louis, U.S.A.

Bernstein, R.; Bernstein, S. 1996. Biology. WCB. WM. C. Brown Publishers, U.S.A.

Berzins, A. 1998. Basic Cloning Proceduers. Springer Verlag, Germany.

Bettelheim, F. A.; March, J. 1998. Introduction to Organic and Biochemistry. Harcourt Brace College Publishers, U.S.A.

Blackstock, J. C. Biochemistry. 1998. Butterworth Heineman, Oxford, U. K.

Borem, A.; Santos, F. R. and Bowen, D. E. 2003. Understanding biotechnology, Prentice Hall.

Boyer, R. 1999. Concepts in Biochemistry Brooks/Cole Publishing Company.

Burton, G. R. W.; Engelkirk, P. G. 2000. Microbiology for the Health Sciences. Lippincot Williams, and Wilkins, Philadelphia, U.S.A.

Cappuccino, J. C.; Sherman, N. 2001. Microbiology, Benjamin Cummings, San Francisco, U.S.A.

Carroll, S. B.; Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. 2005. From DNA to diversity-molecular genetics and the evolution of animal design. Blackwell Publishing.

Champe, P. C.; Harvey, R. A. 2000. Biochemistry. Lippincott-Raven Publishers, U.S.A.

Collado-Vides, J. and Hofestadt, R. 2002. Gene regulation and metabolism. The Bradford Book-The MIT Press.

Concepts Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A.

Copper, H. D.; Spillane, C.; Hodgkin, T. 2001. Broadening the Genetie Base of Crop Ppduction. GABI Publishing, U.K.

Cowell, J. K. 2001. Molecular Genetics of Cancer. Bios Scientific Publishers, U.K.

Davies, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, New York, U.S.A.

Davis, D. S. 2001. Genetic Dilemmas. Routledge, Taylor & Francis Group.

Dennis, C.; Gallagher, R. 2001. The Human Genome, Nature Palgrave, U.S.A.

Dickinson, I. M. 2003. Molecular Plant Pathology. Taylor & Francis Group.

Dominiczak, A. F.; Connell, J. M.; Soubrier, F. 1999. Molecular Genetics of Hypertension, Bios Scientific Publisher, U. K.

Edwards, A. W. 2000. Foundations of Mathematical Genetics Cambridge University Press, U. K.

Elliott, W. H.; Elliott, D. C. 2001. Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, Oxford, U.K.

Enger, E. D.; Ross, F. C. 2000. Concepts in Biology, McGraw-Hill, U.S.A.

Evett, L. W.; Weir, B. S. 1998. Interpreting DNA Evidence, Sinauer Associates, Inc/ Publishers, Sunderland Massachusetts, U.S.A.

Gjerde, D. T.; Hanna, C. P. and Hornby, D. 2002. DNA Chromatography. Wiley-VCH.

Gladwin, M.; Trattler, B. 2000. Clinical Microbiology McGraw-Hill, U.S.A.

Glich, B. R. and Pasternak, J. J. 2005. Molecular Biotechnology-Principles and applications of recombinant DNA. ASM Press.

Goldberg, S. 1999. Clinical Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.

Gould, J. L.; Keeton, W. T. 1996. Biological Science, W. W. Norton & Company, New York, U.S.A.

Graham, G. 2002. Gene-A Philosophical Inquiry. Routledge, Taylor & Francis Group.

Graur, D.; Li, W. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Griffiths, A. F.; Miller, J. H.; Gelbart, W. M. 2000. An Introduction to Genetic Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.

Hamelton, D. 1996. Narrow Roads of Gene Land, W. H. Freeman, U.S.A.

Hammond, S. M.; Lambert, P. A. 1978. Antibiotics and Antimicrobial Action. Wdward Arnold, London, U.K.

Harold, F. M. 2001. The Way the Cell. Oxford University Press, U.K.

Hendrick, P. W. 2000. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.

Heritage, J.; Evans, E. G.; Killington, R. A. 1996. Introductory Microbiology, Cambridge University Press, U.K.

Herren, R. V. 2005. Introduction to Biotechnology-An Agricultural Revolution. Thomson Delmar Learning.

Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press, U.K.

Hey, J. 2001. Genes, Categories and Species. Oxford University Press.

Hope, I. A. 1999. Elegans. Oxford University, Press, U.K.

Horwitz, M. 2000. Basic Concepts in Medical Genetics. McGraw-Hill, U.S.A.

Isenberg, G. 1995. Cytoskeleton Proteins, Springer Verlag, Germany.

Jain, H. K. 1999. Genetics Concepts and Implications, Science Publisher, Inc., Enfield (U.S.A.).

Jamarin, J. 2001. Principles of Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Jordan, B. 2001. DNA Microarays: Gene Expression Applications. Springer Verlag, Germany.

Kereuzer, H.; Massey, A. Recombination DNA and Biotecnology, ASM Press, Washington, D. C., U.S.A.

Kieleczawa, J. 2005. DNA Sequencing-Optimizing the Process and Analysis. Jones and Bartlett Publishers.

Klug, W. S.; Cummings, M. R. 1996. Essentials of Genetics. Prentice-Hall, Inc. U.S.A.

Kontermann, R.; Dubel, S. 2001. Antibody Engineering. Springer Verlag, Berlin, Germany.

Kreuzer, H. and Massey, A. 2005. Biology and Biotechnology- Science, Applications and Issues. ASM Press.

Latchman, D. S. 2005. Gene Regulation. Taylor & Francis Group.

Lesk, A. M. 2001. Introduction to Protion architecture. Oxford University Press.

Lewin, R. 1997. Patterns in Evolution. Scientific American Library, New York, U.S.A.

Lewis, R. 1997. Human Genetics, WCB, Brown Publishers, U.S.A.

Lewis, R. 2001. Human Genetics, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Lewis, R. 2003. Hauman Genetics-Concepts and Applications. McGraw-Hill.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology, W. H. Freeman and Company, U.S.A.

Long, C. 1999. Genetic Testing and use of Information. The AEI Press, Washington. D. C., U.S.A.

Lowrie P.; Wells, S. 2000. Microbiology and Biotech-nology, Cambridge University Press, U.K.

Macdonald, F.; Ford, C. H. J. and Gasson, A. G. 2004. Molecular Biology of Cancer. Taylor & Francis Group.

Malcolm, S.; Goodship, J. 2001. Genotype to Phenotype, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, U.K.

Maloy, S. R.; Cronan, J. E. Freifelder, D. 1994. Microbial Genetics, Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A.

McConkey, E. H. 2004. How the Human Genome works. Jones and Bartlett Publishers.

McGleenan, T.; Wiessing, U.; Ewald, F. 1991. Genetics and Insurance. BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.

Mckane, L.; Kandel, J. 2001. Microbiology, Essentials and Applications. McGraw-Hill, U.S.A.

Melkin, D.; Lindee, M. 1995. The DNA Mystique. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.

Midgley, G.; Clayton, Y. M.; Hay, R. J. 1997. Diagnosis in Colar Medical Mycology, Mosby-Wolfe, Chicago, U.S.A.

Morello, J. A.; Mizer, H. E.; Wilson, M. F. 1998. Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.

Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. 2000. Harper's Biochemistry, McGraw-Hill, U.S.A.

Nicholl, D. T. 1996. An Introduction to Genetic Engineering, Cambridge Univ. Press, U.K.

Nuber, U. A. 2005. DNA Microarrays. Taylor & Francis Group.

Onions, A. H. S.; Smith, D. 1983. Preservation and Maintenance of Living Fungi, C.A.B, Slough, England.

Parker, S. P. 1986. McGraw-Hill Dictionary of Biology, McGraw-Hill, U.S.A.

Passarge, E. 2001. Color Atlas of Genetics. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.

Patrick, G. L. 2001. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford, U.K.

Plomin, R.; DeFries, J. C.; McClearn, G. E.; Rutter, M. 1997. Behavioral Genetics. W.H. Freeman, New York, U.S.A.

Poole, R. K. 1998. Advances in Microbial Physiology, Academic Press, San Diego, U.S.A.

Rabilloud, T. 2000. Proteome Research-Two Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer Verlag, Germany.

Ratledge, C.; Kristiansen, B. 2001. Basic Biotechnology, Cambridge Univ. Press. U.K.

Raven, P. H.; Johnson, G. B. 2002. Biology, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Razdan. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers, Inc.

Ring, C. A.; Blair, E. D. 2001. Genetically Engineered Viruses BIOS Scientific Publisher Limited, U.K.

Roshoški, R. 1996. Biochemistry, W. B. Saunders Company Philadelphia, U.S.A.

Russo, E.; Cove, D. 1995. Genetic Engineering, W. H. Freeman, U.S.A.

Saccone, C. and Pesole, G. 2003. Handbook of Comparative Genomics-Principles and Methodology. John Wiley.

Sapienza, A. M. and Stork, D. 2001. Leading Biotechnology Alliances. Wiley-Liss.

Sermonti, G. 1969. Genetics of Antibiotic Producing Microorganisms, Wiley-Interscience, U.S.A.

Shanson, D. C. 1999. Microbiology in Clinical Practice. Butterworth Heinemann, Oxford, U.K.

Sleifh, J. D.; Timbury, M. C. 1998. Notes on Medical Bacteriology, Churchill Livingstone, New York, U.S.A.

Snustad, D. P.; Simmons, M. J. 2000. Principles of Genetics. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.

Spencer, C. A. 2006. Genes, Aging and Immortality. Pearson-Prentice Hall.

Stearns, S. C.; Hoekstra, R. F. 2002. Evolution an Introduction. Oxford University Press, Oxford, U.K.

Stokes, E. J.; Ridgway, G. L.; Wren, M. W. 1993. Clinical Microbiology. Edward Arnold, London, U.K.

Sussman, M. 1960. Growth and Development. Prentice-Hall, Inc., New Jersy, U.S.A.

Sutton, J. 1998. Biology, McMillan Press, U.K.

Swanson, C. R. 1960. The Cell. Prentice-Hall, Inc., New Jersy. U.S.A.

Talaro, K. P.; Talaro, A. 2002. Foundations in Microbiology, McGraw-Hill, U.S.A.

Teebi, A; Farag, T. 1997. Genetic Disorders Among Arab Populations, Oxford Univ. Press, U.K.

Thieman, W. J. and Palladino, M. A. 2004. Introduction to biotechnology. Pearson Benjamin Cummings.

Thomson, A. J. and Mc Whir, J. 2004. Gene Targeting and Embryonic stem Cell. Taylor & Franics Group.

Ting, I. P. 1982. Plant Physiology. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, U.S.A.

Tourte, Y. 2004. Genetic Engineering and Biotechnology-Concepts, Methods and Agronomic Applications. Science Publishers, Inc.

Twyman, R. M. 2004. Gene Transfer to animal Cells. Taylor & Francis Group.

Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. V. 1999. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc., U.S.A.

Watson, J. D. 2000. A Passion for DNA, Oxford University Press, U.K.

Watson, J. D. 2001. Genes, Girls and Gamow, Oxford University Press, U.K.

Weaver, R. F.; Hendrick, P. V. 2000. Basic Genetics. WCB-Brown Publisher.

Whitford, D. 2005. Proteins Structure and Function. John Wiley.

Wilkins, M. B. 1989. Adbanced Plant Physiology, Longman, Essex, U.K.

Wilson, G. N. 2000. Clinical Genetics, John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A.

Wilson, K.; Walker, J. 2000. Practical Biochemistry: Princuples and Techniques. Cambridge University Press, U.K.

Young, A. G.; Clarke, G. M. 2000. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Population, Cambridge University Press, U.K.

Zubay, G. L. Biochemistry. 1998. WCB-Wm. C. Brown Publishers.

Zubay, G. L.; Parson, W. W.; Vance, D. E. 1995. Principles of Biochemistry, Wm. C. Brown Publishers, U.S.A.

Zweiger, G. 2001. Transducing the Genome. McGraw-Hill, U.S.A.